

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologe Martin Schäfer

aus Köln

Tag der mündlichen Prüfung:

Thema:

**Klonierung und Charakterisierung des *ranBP17*-Gens
im Bruchpunktbereich der Translokation t(5;14) bei
Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie**

Gutachter: Prof. Dr. Werner Buselmaier

Prof. Dr. Hans Matzura

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Grundlagen der Krebsentstehung	1
1.1.1 Onkogene	2
1.1.1.1 Prinzipien der Identifikation von Onkogenen	2
1.1.1.2 Physiologische Bedeutung und pathogene Veränderungen der Proto-Onkogene	4
1.1.2 Tumorsuppressor-Gene	6
1.1.2.1 Physiologische Bedeutung und pathogene Mechanismen von P53	7
1.2 Zellen des spezifischen Immunsystems	8
1.2.1 Genrekombination als Grundlage der spezifischen Immunantwort	8
1.3 Leukämie	11
1.3.1 Chromosomale Translokationen im Rahmen der Leukämieentstehung	12
1.4 Transport zwischen Zellkern und Cytoplasma	13
1.4.1 Mechanismen des nukleären Transportes	13
1.5 Voraussetzungen und Ziele	16
2. Material und Methoden	18
2.1 Material	18
2.1.1 Bakterien (<i>E. coli</i>)	18
2.1.2 Bakteriophagen	18
2.1.3 Eukaryontische Zelllinien	18
2.1.4 Plasmide	19
2.1.5 Enzyme	19
2.1.6 Nukleotide	19
2.1.7 Sequenzierprimer für Plasmide und Lambda-Phagen	20
2.1.7.1 Plasmid-Primer	20
2.1.7.2 Lambda-Primer	20
2.1.7.3 Genspezifische <i>ranBP17</i> -Primer	20
2.1.7.4 Primer für die Genomanalyse	22
2.1.8 DNA- und RNA-Größenmarker	22
2.1.9 Immunglobuline	22
2.1.10 Proteingrößenmarker	23
2.1.11 Flüssige Nährmedien für Bakterien	23
2.1.12 Nährplatten	23
2.1.13 Antibiotika	24
2.1.14 Chemikalien	24
2.1.15 Kits	24
2.1.16 cDNA-Bibliotheken	25
2.1.17 Poly-A ⁺ -Northern Blots	25

2.1.18 Laborgeräte	26
2.1.19 Puffer und Lösungen	26
2.1.19.1 Proteinpuffer	26
2.1.19.2 DNA-Puffer	27
2.1.19.3 RNA-Puffer	29
2.1.19.4 Hybridisierungspuffer	29
2.2 Methoden	30
2.2.1 PCR	30
2.2.1.1 PCR mit Taq-Polymerase	30
2.2.1.2 RT-PCR	31
2.2.1.3 5`-RACE-PCR	31
2.2.1.4 Long Distance PCR	32
2.2.2 DNA-Verdau	33
2.2.3 DNA-5`-Dephosphorylierung	33
2.2.4 Ligation	33
2.2.5 Bakterientransformation	34
2.2.6 DNA-Isolierung	34
2.2.7 RNA-Isolierung	36
2.2.8 DNA-Fragmentisolierung	38
2.2.9 Agarose-Gelelektrophorese	38
2.2.10 Southern Blotting	39
2.2.11 Northern Blotting	39
2.2.12 Screening von cDNA-Bibliotheken	40
2.2.12.1 Bakteriophagenbibliotheken	40
2.2.12.2 Bakterienbibliotheken	41
2.2.12.3 Konvertierung von λ triplEx2 in ptriplex2	42
2.2.13 Radioaktive Hybridisierung	43
2.2.14 DNA-Sequenzierung	44
2.2.14.1 Sequenzreaktion für LICOR	44
2.2.14.2 Sequenzreaktion für ALF-Express	45
2.2.15 Induktion eines GST-Fusionsproteins	47
2.2.16 SDS-PAGE	48
2.2.17 Western Blotting	49

3. Ergebnisse 50

3.1 Expressions-Analysen	50
3.1.1 Klonierung eines 2kb großen cDNA-Fragmentes aus einer humanen foetalen Leber cDNA-Bibliothek	50
3.1.2. Northern Blot Analysen	51
3.1.2.1. Northern Blot Analyse verschiedener humaner Gewebe mit der Sonde 513 51	
3.1.2.2. Northern Blot Analyse von humanem Testis und der Leukämiezelllinie Nalm-6	53
3.1.2.3 Northern Blot Analyse eines ALL-Patienten mit einer t(5;14)	54
3.2 cDNA-Analysen	55
3.2.1 Screening humaner Testis cDNA-Bibliotheken	55
3.2.2 5`-RACE-PCR zur Klonierung des Startcodons	56

3.2.3 Screening einer humanen Testis cDNA-Bibliothek von Clontech	57
3.2.4 cDNA-Sequenzen des <i>ranBP17</i> -Gens	59
3.3 Genomische Analysen des humanen <i>ranBP17</i>	64
3.3.1 Exon-Intron Struktur	64
3.3.2 Lokalisation des <i>ranBP17</i> -Gens auf Chromosom 5	66
3.3.3 Lage des <i>ranBP17</i> -Gens zum Bruchpunkt der t(5;14)(q34;q11)	67
3.3.4 Sequenzierung des PAC-Klons B17610 von Chromosom 5	69
3.4 Western Blot Analysen	71
3.4.1 Induktion eines GST/RanBP17-Fusionsproteins	71
3.4.2 Western Blot eines GST/RanBP17-Fusionsproteins.....	72
3.5 Southern Blot Analyse zur evolutionären Konservierung des <i>ranBP17</i>-Gens	74
3.6 Analysen des murinen <i>ranBP17</i>-Gens	75
3.6.1 RT-PCR Analyse verschiedener muriner Gewebe	75
3.6.2 Screening einer murinen Testis cDNA-Bibliothek	76
3.6.3 Northern Blot Analyse verschiedener muriner Gewebe	77
3.7 Identifizierung des <i>ranBP17</i> homologen Gens <i>ranBP16</i>	77
3.8 Homologievergleich des RanBP17-Proteins	78
3.8.1 Homologievergleich von RanBP17 zu CRM1	83
4. Diskussion	85
4.1 Alternative Spleißformen des <i>ranBP17</i>-Gens	85
4.2 t(5;14) bei ALL und Deregulation der biologischen Funktion des RanBP17-Proteins	86
4.3 Rolle des TCR_δ-Enhancers bei der t(5;14)	88
4.4 Evolutionäre Konservierung	90
4.5 Ausblick	91
5. Zusammenfassung	92
6. Literaturverzeichnis	93
7. Danksagung	107

Abkürzungen

A	Adenosin
AA	AminoAcid (Aminosäure)
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BAC	Bacteria Artificial Chromosome
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	copy Desoxynucleic Acid
cfu	colony forming unit
Ci	Curie
cm	Zentimeter
CIP	Calf Intestinal Phosphatase (Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
ddNTP	Didesoxy-Nucleosidtriphosphat
dNTP	Desoxy-Nucleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G	Guanin
g	Gramm
GIT	Guanidiniumisothiocyanat
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunden
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropylthio- β -Galactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
KV	KiloVolt
L	Liter
lacZ	β -Galaktosidase-Gen
LB	Luria Bertani Broth
M	Molar
m	Milli
mA	Milli-Ampère
min.	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger-Ribonucleic Acid
n	Nano
OD	optische Dichte
p	Pico
PAC	P1 Artificial Chromosome
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PEG	Polyethylenglykol
pfu	plaque forming unit
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	Rounds per minute
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse transcription Polymerase-Chain-Reaction
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
sek.	Sekunden
T	Thymin
TEMED	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tm	Schmelztemperatur
tRNA	Translational Ribonucleic Acid
U	Unit
ÜN	Über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
V	Volt
v	Volume
W	Watt
w	Gewicht
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
μ	Mikro
∞	unendlich

Ein-Buchstaben-Code für Aminosäuren

A	Alanin	Y	Tyrosin
B	Asparagin oder Asparaginsäure	Z	Glutamin oder Glutaminsäure
C	Cystein		
D	Asparaginsäure		
E	Glutaminsäure		
F	Phenylalanin		
G	Glycin		
H	Histidin		
I	Isoleucin		
K	Lysin		
L	Leucin		
M	Methionin		
N	Asparagin		
P	Prolin		
Q	Glutamin		
R	Arginin		
S	Serin		
T	Threonin		
V	Vali		

1. Einleitung

1.1 Grundlagen der Krebsentstehung

Krebs ist nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die häufigste Todesursache in den Industrieländern. Die Krebsforschung dient dem Verständnis der Wirkungsweise der daran beteiligten Faktoren und damit einer effektiveren Diagnostik und Therapie. Zur Zeit sind über 100 verschiedene Krebsarten bekannt, von denen die meisten jedoch selten auftreten.

Die Ursache maligner Erkrankungen ist das klonale, unkontrollierte Wachstum von körpereigenen Zellen, das zumeist auf mehreren genetischen Defekten beruht. Krebszellen sind in der Lage, sich aus ihrem Verband zu lösen und sich an anderen Stellen anzusiedeln (Metastase). Im Gegensatz dazu verbleiben benigne Tumore an ihrem Entstehungsort. Neoplasien werden je nach dem Gewebe, aus dem sie entstanden sind, in Karzinome (Epithelzellen), Sarkome (Bindegewebe, Blutgefäße) und Leukämien/Lymphome (lymphatisches System) unterteilt.

Der Ausgangspunkt für Neoplasien sind meistens strukturelle Veränderungen der DNA, die Mutationen. Durch eine Reihe von Beobachtungen konnte die Erkenntnis, daß die Entwicklung eines Tumors auf genetischen Defekten basiert, gestützt werden: a) bestimmte humane Tumore werden nach den Mendelschen Gesetzen vererbt; b) zahlreiche Neoplasien weisen ganz spezifische Veränderungen des Chromosomensatzes auf (Sandberg, 1980; Yunis, 1983; Rowley, 1984); c) Patienten mit einem gestörten DNA-Reparatursystem sind zur Tumorentwicklung prädisponiert (Cleaver, 1968; Ponder, 1980) und d) die meisten Karzinogene (Ames, 1979) induzieren als Mutagene auch Veränderungen der DNA.

Die von den Mutationen betroffenen Tumorgene stellen positive und negative Regulatoren des Zellwachstums, der Gewebedifferenzierung sowie des programmierten Zelltodes (Apoptose) dar. Man unterteilt die bisher über 200 charakterisierten Tumorgene in zwei Klassen. Onkogene kodieren für strukturell veränderte oder fehlregulierte Proteine („gain of function“), deren tumorigenes Potential bereits von einem defekten Allel ausgehen kann (dominante Tumorgene). Bei den rezessiven Tumorsuppressor-Genen werden Neoplasien erst durch zwei defekte Allele (rezessive Tumorgene) und damit über den Verlust des funktionstüchtigen Proteins begünstigt („loss of function“).

Die Charakterisierung eines potentiellen Tumorgens, das für die Entstehung einer Subform akuter lymphatischer Leukämien (ALL) pathogenetisch relevant ist, stellt die Grundlage der vorgelegten Arbeit dar.

1.1.1 Onkogene

1.1.1.1 Prinzipien der Identifikation von Onkogenen

Klonierung zellulärer Äquivalente viraler Onkogene

Der erste Nachweis von Onkogenen ist Befunden der Tumorstudiologie zu verdanken. Die Beobachtung, daß eine Tumorstuduktion durch Retroviren möglich ist, führte zu der Entdeckung viraler Onkogene.

In dem aus Hühnersarkomen isolierten Rous Sarcoma Virus, konnte neben den Virus-spezifischen Genen, *v-src* als erstes virales Onkogen identifiziert werden. Spätere Untersuchungen ergaben, daß diese aus Tumorstudiren isolierten *v-onc* (= *viral*) Gene, zellulären Ursprungs sind und von den Retroviren während der Transduktion aus dem Wirtsgenom aufgenommen wurden. Die *v-onc* Gene sind im Vergleich zu ihren zellulären Gegenständen, den *c-onc* (= *cellular*) Genen oder Proto-Onkogenen, strukturell verändert. In der Folgezeit ist es gelungen die Funktion von etwa 30, dieser evolutionär hoch konservierten *c-onc* Gene, zu charakterisieren. Ihre Beteiligung bei der Entstehung menschlicher Tumore konnte für einige dieser Gene belegt werden.

virales Onkogen	Virusstamm	Funktion
<i>v-src</i>	Rous Sarcoma Virus	Tyrosin-Kinase
<i>v-abl</i>	Abelson Murine Leukemia Virus	Tyrosin-Kinase
<i>v-h-ras</i>	Harvey Rat Sarcoma Virus	G-Protein
<i>v-myc</i>	Avian Myelocytomatosis	DNA-bindendes Protein

Tabelle 1: Beispiele retroviraler Onkogene

Insertionsmutagenese

Eine weitere Möglichkeit der Tumorstuduktion durch Retroviren, stellt die Insertion eines Wildtyp-Virusgenoms in räumlicher Nähe eines zellulären Proto-Onkogens dar. Dieser Vorgang kann ebenfalls zu strukturellen Veränderungen oder Fehlregulationen von Proto-Onkogenen führen und damit eine Tumorentstehung auslösen.

Ein Beispiel hierfür ist die Aktivierung der *int-1* und *int-2* Gene durch Integration des Mouse Mammary Tumor Virus; dies führt zur Bildung von Mammakarzinomen in Mäusen.

DNA-Transfektionsassays

Eine weitere Möglichkeit der Onkogen-Identifizierung stellt der DNA-Transfektionsassay dar. Dabei wird aus humanen Tumoren isolierte DNA in eine murine Fibroblasten-Zelllinie

(NIH/3T3-Zellen) eingebracht. Bruchstücke der humanen DNA integrieren in das Genom der Rezipientenzellen. Sollte hierbei ein aktiviertes Onkogen der humanen DNA transfiziert worden sein, so kann dies zu morphologischen Veränderungen der murinen Zelllinie führen (Shih et al., 1979). Es bildet sich ein sogenannter Focus. Durch Isolierung der humanen DNA aus diesen Foci und mehrfach wiederholter Transfektion in NIH/3T3-Zellen findet eine „Aufreinigung“ des potentiellen Onkogens statt. Eine morphologische Auffälligkeit nach Transfektion eines aktivierten Onkogens wird jedoch nicht immer beobachtet. Deshalb wird in einer Variante des Transfektionsassays, dem sogenannten Tumorigenizitätsassay (Fasano et al., 1984; Brown et al., 1984), die humane DNA in Begleitung des Neomycinresistenz-Gens in die Zellen transfiziert. Die Selektion der stabilen Transfektanten wird mit dem Neomycin-Analogon G418 durchgeführt. Anschließend werden die Zellklone in immundefiziente Nacktmäuse gespritzt. Dies führt gegebenenfalls zur Ausbildung von Malignomen (Murray et al., 1981). Die Aufreinigung der DNA aus diesen Tumoren über mehrere Transfektionsrunden ermöglicht den Nachweis des betreffenden Onkogens. Auf diese Weise wurden zahlreiche Onkogene identifiziert. Ein Beispiel hierfür ist die Klonierung des humanen Onkogens *h-ras*, das aus der DNA einer Blasentumor-Zelllinie isoliert wurde (Cooper et al., 1984; Weinberg, 1985; Barbacid, 1987). Einige der auf diese Weise isolierten Onkogene wurden nicht in dem Originaltumor sondern erst im Rahmen der DNA-Transfektion aktiviert. Diese Gene besitzen somit eine potentielle Bedeutung in der Tumorgenese. Das *ret*-Gen, das bei multiplen Neoplasien Typ2A und Typ2B sowie dem Morbus Hirschsprung aktiviert ist, konnte primär durch einen solchen Transfektionsartefakt identifiziert werden.

Klonierung von Bruchpunktregionen tumorspezifischer Chromosomenanomalien

Cytogenetische Untersuchungen zeigen, daß in zahlreichen Tumoren reziproke Translokationen zweier Chromosomenabschnitte beobachtet wurden. Die pathogenen Folgen können dabei aus einer Fusion zweier Gene und somit der Bildung eines Fusionsproteins oder aus einer Fehlregulation eines Gens durch translozierte Regulatorelemente resultieren. Ein gut charakterisiertes Beispiel stellt die Philadelphia-Translokation (Nowell and Hungerford, 1960) zwischen den Chromosomen 9 und 22, $t(9;22)(q34;q11)$, dar. Diese kann in ca. 95% der CML- (chronisch myeloische Leukämie) und ca. 30% der ALL-Patienten (akute lymphatische Leukämie) nachgewiesen werden. Die Klonierung der Bruchpunktregion des Philadelphia-Chromosoms ergab, daß es hierbei zu einer Fusion zwischen den Proto-Onkogenen *bcr* und *abl* kommt. Bis heute wurden circa 130 chromosomale Translokationen molekular charakterisiert.

1.1.1.2 Physiologische Bedeutung und pathogene Veränderungen der Proto-Onkogene

Proteine, die durch Proto-Onkogene kodiert werden, nehmen eine wichtige Funktion in der Signalübertragung von Zellen ein. Ihr Wirkungsspektrum reicht von Wachstumsfaktoren, über Rezeptoren und intrazelluläre Signalmediatoren, bis hin zu nukleären Transkriptionsfaktoren und Zellzyklusregulatoren. Die strukturellen Veränderungen dieser Proto-Onkogene, kann zu qualitativen Veränderungen der Proteinstruktur oder aber zu quantitativen Veränderungen ihrer Expression führen. Diese unterschiedlichen Ereignisse können während der Tumorprogression synergistisch wirken. Beispiele für Mechanismen, die diese pathogenen Veränderungen herbei führen können, sind Punktmutationen (*ras*), Translokationen (*bcr-abl*), Austausch von Regulatorsequenzen (*myc*) und Amplifikationen (*n-myc*). Diese sollen im folgenden kurz beschrieben werden.

ras

RAS-Proteine (H-RAS, K-RAS, N-RAS) stellen eine Familie von sogenannten kleinen Guaninnucleotid-bindenden Proteinen dar. Sie sind Monomere, die über eine Farnesyl-Gruppe in der Plasmamembran verankert werden. Wird RAS durch einen Rezeptor aktiviert, findet ein Austausch des gebundenen GDP durch GTP statt. Diese aktive Form der RAS-Proteine wird durch eine intrinsische GTPase Aktivität reguliert, die wiederum durch GTPase aktivierende Proteine (GAPs) verstärkt wird. Die Spaltung von GTP zu GDP und Phosphat deaktiviert RAS-Proteine und ermöglicht somit eine kontrollierte, zeitlich begrenzte Übertragung eines Signals. RAS-vermittelte Signalübertragungen nehmen eine Schlüsselstellung in vielen wichtigen zellulären Prozessen (Proliferation, Differenzierung) ein.

Die häufigsten strukturellen Änderungen der *ras*-Onkogene stellen Punktmutationen dar, die die intrinsische GTPase-Aktivität beeinflussen. Es entstehen konstitutiv aktive RAS-Proteine, deren Aktivität auch durch GAPs nicht mehr inhibierbar ist. Diese Punktmutationen finden sich bevorzugt in den Codons 12, 13 und 61. *Ras*-Mutationen stellen die häufigste Onkogenveränderung menschlicher Tumore dar. So ist in über 90% aller Pankreaskarzinomen eine Mutation im Codon 12 von *k-ras* zu beobachten. Weiterhin weisen ungefähr 25% aller AML-Patienten eine *n-ras* Onkogenaktivierung auf.

bcr-abl

ABL und BCR sind Proteinkinasen. ABL weist mit seinen typischen SH2/SH3-Domänen und seiner Tyrosinkinase-Aktivität alle Merkmale eines Proteins der Phosphorylierungskaskade auf. Nach Aktivierung des ABL-Proteins findet ein Übergang in den Zellkern statt, wo es mittels seiner DNA-bindenden Domäne, die Expression weiterer Gene wie *myc* und *bcl-2* beeinflusst. BCR läßt sich in die Kategorie der Serin-, Threoninkinasen einordnen und kann über seine SH2-bindende Domäne mit anderen Proteinen interagieren. Aktiviertes BCR fungiert als GTPase-aktiverendes Protein der RAS-Familie.

Die Bildung des BCR-ABL Fusionsproteins, in der bereits genannten Philadelphia-Translokation, führt zu einer Fixierung des tetrameren Fusionsproteins am Cytoskelett sowie der Aktivierung der Tyrosinkinase von ABL. Dadurch wird eine Vielzahl von Signalkaskaden dereguliert. Zudem ist die transkriptionelle Regulation des antiapoptotischen *bcl-2*-Gens durch ABL nicht mehr möglich (Kurzrock et al., 1988).

myc

Die beiden vorangegangenen Beispiele dokumentieren den Einfluß qualitativer Veränderungen von Proto-Onkogenen auf die Tumorgenese. Anhand der Rolle von *c-myc* bei Burkitt-Lymphomen soll die Auswirkung einer quantitativen Veränderung eines Proto-Onkogens beschrieben werden.

MYC stellt einen Transkriptionsfaktor dar, der abhängig vom jeweiligen Signal- und Gewebekontext, unterschiedliche Zellprozesse reguliert. Diese beinhalten Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose. Die Transkriptionsaktivität von MYC basiert auf einem basic Helix-Loop-Helix- und einem Leucin-Zipper-Motiv sowie N-terminalen Transaktivierungsdomänen. MYC ist nur in Form eines MYC-MAX Heterodimerkomplexes aktiv. MAX besitzt jedoch keine Transaktivierungsdomäne, somit ist MYC der entscheidende Regulator für die Zielgene.

In allen Burkitt-Lymphomen kommt es zu einer Aktivierung des *myc*-Gens. Diese Aktivierung erfolgt durch Rekombination des *myc*-Locus auf Chromosom 8q24 in unmittelbarer Nähe eines Enhancers der Immunglobulingene der Chromosomen 14, 2 oder 22 (Rabbitts et al., 1983; Rabbitts and Boehm, 1991). Zudem wird das MYC-Protein nicht nur überexprimiert, sondern zugleich durch Mutationen in der Transaktivierungsdomäne, regulatorischen Einflüssen entzogen (Bhatia et al., 1993).

n-myc

Ein weiterer Prozess, der die Expression eines Gens erhöhen kann, ist die Genamplifikation, welche man zumeist in fortgeschrittenen Tumorstadien findet und zur Tumorprogression beiträgt. Ein bekanntes Beispiel ist die Amplifikation des *myc*-verwandten *n-myc* Gens bei Neuroblastomen. Das *n-myc* Gen wird am häufigsten in den weit fortgeschrittenen Tumorstadien III und IV in mehreren hundert Kopien gefunden, welches mit einer schlechten Prognose einhergeht (Kohl et al., 1983, 1984).

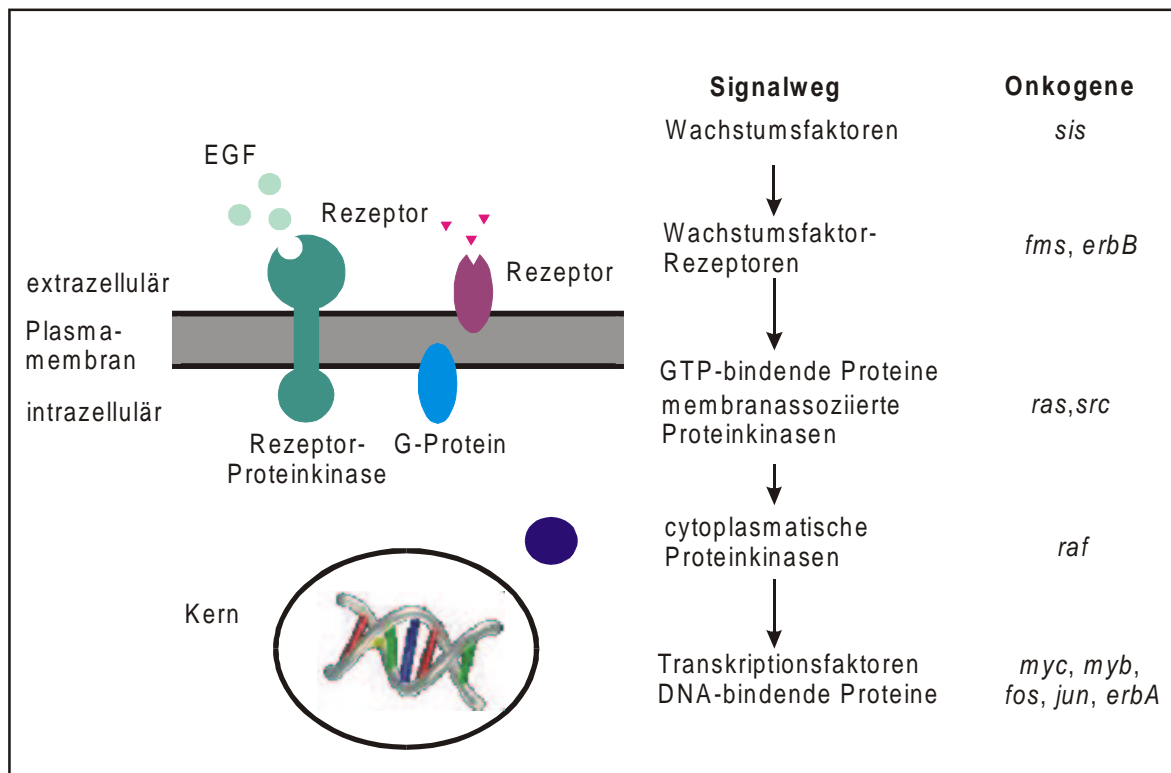


Abbildung 1: Onkogene in der Signaltransduktion

1.1.2 Tumorsuppressor-Gene

Vergleichbar mit den Onkogenen kodieren Tumorsuppressor-Gene für Proteine, die wichtige Funktionen in der Regulation der Signalübertragung und des Zellzyklus ausüben. Im Gegensatz zu den Onkogenen beruht ihre Funktion in der Inhibition Signal-übertragender Abläufe. Zu ihnen gehören GTPase stimulierende Proteine, Proteinphosphatasen als Gegenspieler der Proteinkinasen, Inhibitoren der Zellzyklus-aktivierenden Kinasen sowie Transkriptionsfaktoren und deren Inhibitoren. Aufgrund dieser negativ regulierenden Eigenschaften ist eine Tumorgenese nur beim vollständigen Verlust der Tumorsuppressor-Funktion gegeben. Mutationen, die zu diesem Verlust führen, sind Deletionen und

Punktmutationen oder aberrante Interaktionen mit anderen Proteinen. Dies soll im folgenden am Beispiel des *p53*-Gens dargestellt werden.

1.1.2.1 Physiologische Bedeutung und pathogene Mechanismen von P53

Das Tumorsuppressorgen *p53* kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der eine zentrale Stellung in der Kontrolle des Zellzyklus einnimmt (Vogelstein and Kinzler, 1993). Das Protein setzt sich aus 3 Funktionsdomänen zusammen: a) N-terminale Transaktivierungsdomäne b) DNA-bindende Domäne und c) C-terminale Regulatordomäne. Die physiologische Funktion von P53 besteht in dem Schutz der Zelle vor genomischem Stress, wie DNA-Schädigung durch UV-Strahlung, ionisierende Strahlung oder chemisch mutagene Substanzen und andererseits der pathologischen Aktivierung von Onkogenen.

Die P53-Konzentration einer Zelle hängt von der Interaktion mit dem Protein des *mdm2*-Gens ab. P53 aktiviert die Expression von MDM2 (Fakharzadeh et al., 1991), das wiederum den Ubiquitin-vermittelten P53-Abbau in Proteasomen induziert. Dieser Regelkreis zwischen P53 und MDM2 wird in Folge einer DNA-Schädigung durch Phosphorylierung von P53 unterbrochen. Dabei kommt es durch Anreicherung von P53 zur Expression des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors P21. Dieser inaktiviert die Interaktion der Cycline D/E mit Cyclin-abhängigen-Kinasen (CDKs). Die Folge ist eine Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase. Ein weiteres Zielgen nach der P53-Aktivierung ist *14-3-3* (Hermeking et al., 1997), dessen Protein phosphoryliertes CDC25 inaktiviert und damit die Zelle in der G2-Phase arretiert. Durch den unterbrochenen Zellzyklus ist die Zelle in der Lage die DNA-Schädigung zu beheben. Auf diese Weise wird verhindert, dass Mutationen in weiteren Zellteilungen fortschreiten können. Ist eine DNA-Schädigung irreparabel, wird die betreffende Zelle durch Apoptose (programmierter Zelltod) eliminiert. P53 übt dabei als Repressor, durch Bindung an das anti-apoptotische Gen *bcl-2* und als Transkriptionsfaktor für das pro-apoptotische *bax*-Gen, wesentliche Kontrollfunktionen aus.

Mutationen des *p53*-Gens oder Veränderungen des P53-Gleichgewichts in der Zelle, werden in humanen Neoplasien als häufigste Aberrationen eines Tumorsuppressors beobachtet. In 50% aller humanen Tumore werden Punktmutationen von *p53* nachgewiesen. Dabei handelt es sich vorwiegend um missense Mutationen. Genamplifikationen des Interaktionspartners

MDM2 haben den gesteigerten Abbau von P53 zur Folge. In jedem Fall kommt es zu einem „loss of function“, des Tumorsuppressors P53.

1.2 Zellen des spezifischen Immunsystems

Zur Abwehr fremder Moleküle (Antigene) verfügen Vertebraten über ein spezifisches Immunsystem. Die nahezu unbegrenzte Anzahl von Antigenen erfordert dabei die Synthese einer Vielzahl von Antikörpern, deren Vielfalt hauptsächlich auf somatischer Rekombination und Mutation beruht. Zwei Rezeptortypen des Immunsystems lassen sich unterscheiden: die von B-Lymphocyten synthetisierten Immunglobuline (Ig) und die von T-Lymphocyten gebildeten T-Zell-Rezeptoren (TCR). Die Immunglobuline werden von ausdifferenzierten B-Lymphocyten (Plasmazellen) ins Blut sezerniert (humorale Abwehr), wohingegen die T-Zell-Rezeptoren membranständig durch Interaktion mit Molekülen des MHC-Komplexes (major histocompatibility complex) die zelluläre Abwehr vermitteln. Die Immunglobuline setzen sich aus zwei identischen schweren (heavy, H) und zwei identischen leichten (light, L) Polypeptidketten des κ - oder λ -Typs zusammen. Bei den T-Zell-Rezeptoren wird die α - mit der β -Kette oder die γ - mit der δ -Kette zu einem funktionellen Molekül kombiniert. Die Erkennung von Antigenen erfolgt bei Immunglobulinen wie bei T-Zell-Rezeptoren durch den aminoterminalen variablen (V) Bereich. Der konstante, am Carboxylende befindliche Abschnitt (C), ist bei Ig und TCR für die Effektorfunktion verantwortlich.

1.2.1 Genrekombination als Grundlage der spezifischen Immunantwort

Der variable Bereich, der die Spezifität der Antigenerkennung durch Ig oder TCR ausmacht, wird durch die Rekombination von drei verschiedenen Gensegment-Typen gebildet. Ein V-Element (variability) wird mit einem D- (diversity) und einem J-Element (joining) zu einer funktionstüchtigen Einheit des variablen Bereichs verbunden. Da die D-Elemente nur in den Genloci von IgH, TCR β und TCR δ enthalten sind, kommt es bei den übrigen Ig- und TCR-Genen zu einer VJ-Rekombination. Nach dem Rearrangement der Gensegmente auf der DNA-Ebene und der Transkription zur RNA, erfolgt die Prozessierung zur reifen mRNA.

Dabei wird bei den Ig-Ketten am 5'-Ende eine Leadersequenz angehängt, die den transmembranen Transport des Proteins erleichtert.

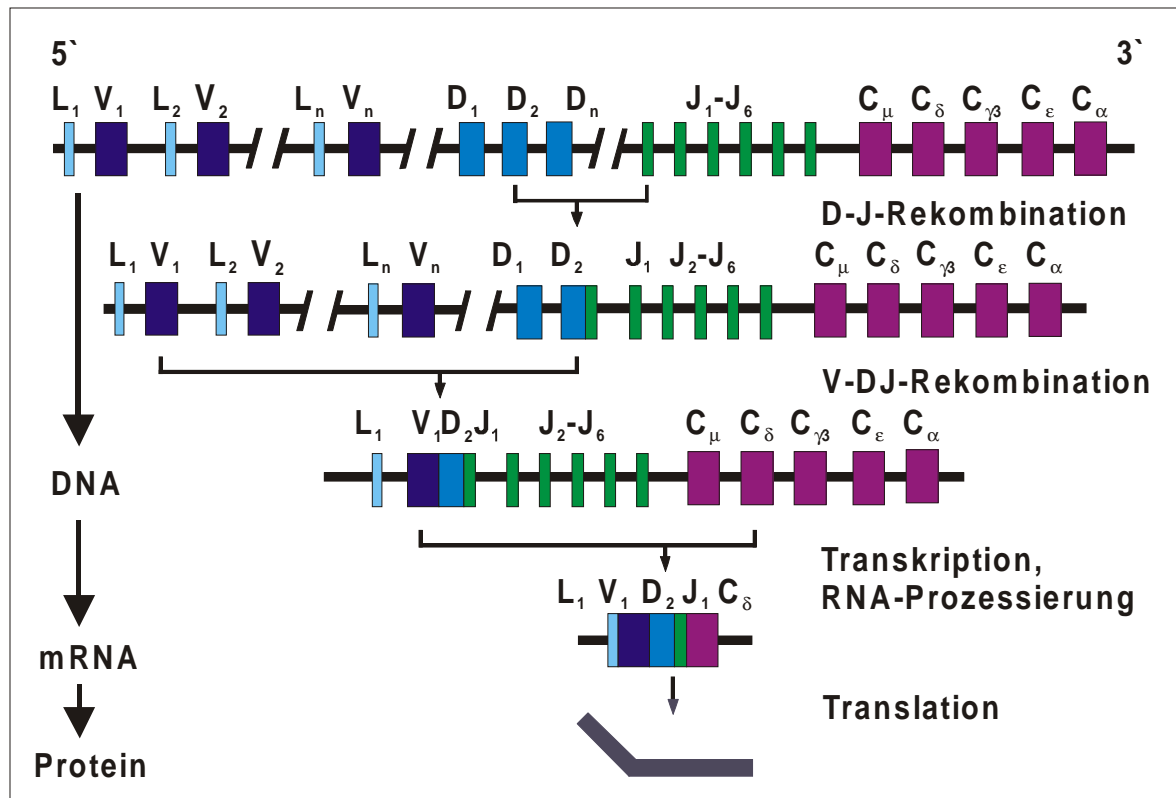


Abbildung 2: Rekombination und Synthese der Immunglobulin schweren Kette (L=Leadersequenz, V = V-Element, D = D-Element, J = J-Element, C = C-Element)

Die Rekombination der VDJ-Elemente erfolgt über die Rekombinations-Signal-Sequenzen (RSS) am 5'- und 3'-Ende der VDJ-Elemente. Die RSS beinhalten eine Heptamer- und eine Nonamersequenz, die entweder durch einen 12bp-Spacer (= one turn) oder durch einen 23bp-Spacer (= two turn) getrennt sind. Die Heptamer- und Nonamersequenzen enthalten Nukleotide, die für den Rekombinationsprozess unerlässlich sind. Die Rekombination folgt dabei der Regel, daß nur Elemente mit 12bp Spacer mit Elementen, die einen 23bp Spacer aufweisen, rekombinieren können, so daß beispielsweise die Elemente für die IgH-Kette nur in der physikalischen Reihenfolge VDJ rearrangiert werden können. Der Vorgang der V(D)J-Rekombination wird durch die Proteine der Gene *rag1/rag2* (Rekombination aktivierendes Gen) und *hmg1/hmg2* (high-mobility group protein) gesteuert. Dabei fungieren Komplexe aus RAG1/RAG2 und HMG1/HMG2 als Endonukleasen, die genau zwischen RSS und den kodierenden Gensegmenten schneiden (van Gent et al., 1997; Sawchuk et al., 1997; Kim and Oettinger, 1998). Die RSS und die dazwischen liegenden DNA-Bereiche werden als ringförmige, extrachromosomale DNA („signal joint“) von der Zelle abgebaut. Die beiden

Enden der kodierenden Gensegmente bilden jeweils eine Haarnadelstruktur. Die Proteine KU70 und KU80 bilden an den Haarnadelstrukturen den KU-Komplex, der eine Serin/Threoninkinase (DNA-PKcs) bindet. Dieser, als DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) fungierende Proteinkomplex, aktiviert verschiedene Proteine. Eine Endonuklease öffnet die Haarnadelstrukturen symmetrisch oder unter Bildung eines Palindroms asymmetrisch. Anschließend werden die einzelsträngigen DNA-Enden durch eine DNA-Polymerase aufgefüllt. Die lymphocytenspezifische Terminale-desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) ist in der Lage an die offenen DNA-Enden der beiden Gensegmente neue Nukleotide anzukoppeln. Ebenso können Nukleotide von den kodierenden Bereichen entfernt werden. Die Verbindung beider Gensegmente erfolgt abschließend durch einen Komplex aus XRCC4 und der DNA-Ligase 4 („coding joint“).

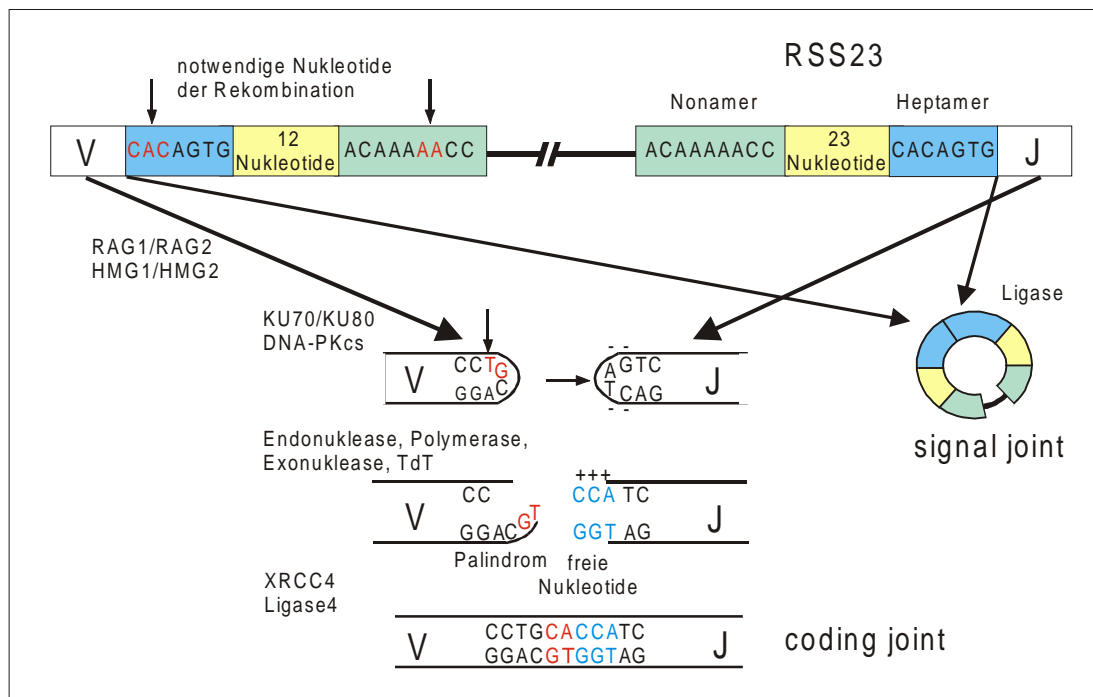


Abbildung 3: VJ-Rekombination unter Bildung von „signal joint“ und „coding joint“

Neben der Vielfalt der Keimbahnsegmente, tragen die bereits erwähnten Deletionen und Insertionen von Nukleotiden bei der Verknüpfung der Elemente sowie somatische Mutationen in den rekombinierten Elementen, zu der Vielfalt der Ig und TCR bei.

Die unterschiedlichen Immunglobulinklassen werden durch ein „Switching“ der C_H-Elemente unter Beibehaltung der rearrangierten variablen Bereiche erzielt. Dabei kann eine B-Zelle, die als primäre Immunantwort IgM oder IgD bildet, durch eine DNA-Rekombination zu einer IgG, IgA oder IgE exprimierenden Zelle werden. Dies wird durch 5'-gelegene

Umschaltsequenzen („switch-Elemente“; Alt et al., 1987), an den C-Elementen ermöglicht. Den Auslöser zum Klassenwechsel stellt die Bindung von CD40, das von CD4⁺-T-Helferzellen exprimiert wird, an seinen Rezeptor dar.

1.3 Leukämie

Leukämien stellen maligne Neoplasien der Lymphopoese dar. Bei der normalen Lymphocytenreifung im Knochenmark und im Thymus entstehen aus den pluripotenten Stammzellen ausdifferenzierte B- oder T-Zellen. Der ausdifferenzierte Zustand der Leukocyten wird bei der Leukämie nicht erreicht. Vielmehr werden nicht differenzierte Entwicklungsstadien klonal vermehrt. Diese undifferenzierten Zellen proliferieren unkontrolliert und üben keine Funktion in der Immunantwort aus.

Leukämien werden unterteilt in:

1. Akute lymphatische Leukämie (ALL)
2. Akute myeloische Leukämie (AML)
3. Chronisch lymphatische Leukämie (CLL)
4. Chronisch myeloische Leukämie (CML)

Neben der Einteilung der Leukämien anhand des klinischen Verlaufs, der Zellmorphologie und cytochemischer Merkmale, werden immunologische Methoden zur weiteren Differenzierung eingesetzt. Der Einsatz monoklonaler Antikörper ermöglicht dabei die Identifizierung der Differenzierungsstadien leukämischer Zellen mittels membranständiger sowie cytoplasmatischer Antigene. So wird das Protein CD10 (cALL) in Prä-Prä-B-Zellen erstmals identifiziert, wohingegen kaum eine Expression in frühen B-Zellen und gar keine Expression in reifen B-Zellen festzustellen ist. Die Immunogenotypisierung der Ig- und TCR-Rearrangements stellt eine zusätzliche Möglichkeit zur Charakterisierung des Differenzierungsstadiums leukämischer Zellen dar. So kann beispielsweise ein Rearrangement der TCR β - und TCR γ -Gene, ohne IgH-Rekombination trotz gleichzeitiger Expression von B-Zell- und T-Zell-Markern, eine T-Zell-Leukämie identifizieren.

1.3.1 Chromosomale Translokationen im Rahmen der Leukämieentstehung

Spezifische chromosomale Translokationen besitzen pathogenetische Relevanz bei Neoplasien des Immunsystems. Dabei erfolgt eine Onkogenaktivierung (z.B. *myc*) über die Translokationen regulatorischer Elemente der Ig-Loci bei Burkitt-Lymphomen oder es kommt zur Bildung eines chimären Fusionsgens wie *bcr-abl* bei der CML.

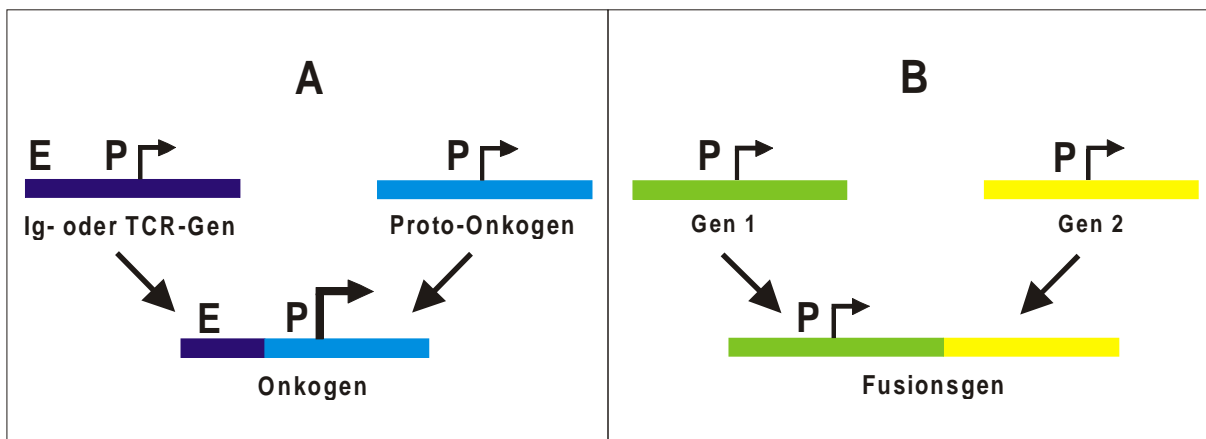


Abbildung 4: A: Aktivierung eines Proto-Onkogens über einen Enhancer (E) eines Ig- oder TCR-Gens; B: Bildung eines Fusionsproteins aus zwei verschiedenen Genen mit neuen Eigenschaften (P = Promotor)

Viele Translokationen der Ig- und TCR-Loci lassen sich auf fehlerhafte V(D)J-Rekombinationen zurückführen. In den RSS, den für die Rekombination unerläßlichen Signalsequenzen, treten Nukleotide auf, die in ähnlicher Folge auch im übrigen Genom zu finden sind. Solche kryptischen Sequenzen können durch fehlerhafte Nutzung zur aberranten Rekombination während der Lymphopoese führen und dadurch maligne Erkrankungen des lymphatischen Systems auslösen.

So werden beispielsweise bei der ALL Regulatorsequenzen der IG- und TCR-Loci häufig in den Bereich von Homeoboxgenen, deren Proteine als Transkriptionsfaktoren fungieren, transloziert (Hayashi and Scott, 1990; Dubé et al., 1991; Hatano et al., 1991; Kennedy et al., 1991; Lu et al., 1991). Auf diese Weise bedingt das in normalen T-Zellen nicht exprimierte *hox11* die Entstehung einer T-Zell Leukämie (Salvati et al., 1995).

Der Mechanismus des „Class switching“ bei der Rekombination von C_H-Elementen stellt einen weiteren Angriffsort dar. Auch durch Fehler in diesem Rekombinationsprozess können Translokationen entstehen (Kingzette et al., 1998).

1.4 Transport zwischen Zellkern und Cytoplasma

Eukaryontische Zellen sind durch eine Kompartimentierung in Zellorganellen charakterisiert. Dazu gehören die Zellmembran, das Cytoplasma, die Mitochondrien, der Golgi-Apparat, das Endoplasmatische Retikulum (ER) und der Zellkern. Diese Kompartimentierung ermöglicht u.a. die gezielte Kontrolle der transkriptionellen/translationellen Regulation, die Stabilität des Genoms und die Prozessierung von prä-mRNA im Zellkern.

Der Zellkern ist vom Cytoplasma durch die Kernmembran getrennt. Diese wird durch eine Doppellipidschicht gebildet, die mit Kernporenkomplexen (NPCs = nuclear pore complexes) durchsetzt ist. Die NPCs regulieren den Transport von Makromolekülen, wie Proteinen, tRNA, rRNA sowie mRNA zwischen dem Zellkern und dem Cytoplasma. Ribosomale Proteine werden beispielsweise nach dem Import in den Kern mit rRNA zu funktionsfähigen Ribosomen verbunden und letztlich wieder in das Cytoplasma exportiert.

Proteine des Transportsystems zwischen Zellkern und Cytoplasma sind an der Übertragung von Signalen in der Zelle beteiligt. Die Fehlregulation von Proteinen des Kerntransportes durch chromosomale Translokation kann einen erheblichen Einfluß auf Zellwachstum und Zelldifferenzierung ausüben.

1.4.1 Mechanismen des nukleären Transportes

Die ca. 3000-5000 Kernporenkomplexe in einer humanen proliferierenden Zelle bestehen aus ca. 50-100 verschiedenen Proteinen, den sogenannten Nucleoporinen. Diese besitzen charakteristische AA-Sequenzen und strukturelle Domänen, die als Interaktions- sowie als Andockstellen für Kerntransportfaktoren dienen.

Größere Substrate ($\geq 20\text{-}30\text{kDa}$) werden von diesen Kerntransportfaktoren anhand spezifischer Signale (NLS = nuclear localization signal; NES = nuclear export signal) erkannt und aktiv durch die Kernporenkomplexe transportiert. Vier Schlüsselproteine, die in dem NLS/NES-vermittelten aktiven Transport involviert sind, konnten bisher charakterisiert werden: Importin α (Adam and Adam, 1994; Görlich et al., 1994); Importin β (Adam and Adam, 1994; Chi et al., 1995; Imamoto et al., 1995a; Görlich et al., 1995b; Radu et al., 1995a); RAN (Melchior et al., 1993a; Moore and Blobel, 1993) und der Kerntransportfaktor NTF2 (Moore and Blobel, 1994; Paschal and Gerace, 1995).

Der aktive Transport zwischen Zellkern und Cytoplasma findet weitgehend durch eine Superfamilie von Transportrezeptoren statt, die eine Importinβ ähnliche N-terminale RanGTP-bindende Domäne besitzen (Fornerod et al., 1997b; Görlich et al., 1997). In Abhängigkeit der vermittelten Transportrichtung werden Importine und Exportine unterschieden.

	Cytoplasma	Kernporenkomplex	Zellkern
Import	Importin + Substrat	→ Importin-Substrat-Komplex	→ Importin-RanGTP Substrat
RanGTP RanGDP + P_i	RanGDP P _i	↔ RanGDP/NTF2	↔ RanGTP
Export	Exportin Substrat RanGDP P _i	← Exportin-Substrat RanGTP- Komplex	← Exportin + Substrat + RanGTP

Tabelle 2: Aktiver RanGTP/GDP-vermittelter Transport zwischen Cytoplasma und Zellkern

Im einfachsten Fall werden Substrate direkt durch den Transportrezeptor erkannt und durch den Kernporenkomplex transportiert. Direkt über das NLS an das Substrat bindende Importine werden als dimerer Komplex durch den NPC transloziert und anschließend im Kern durch Bindung von RanGTP von diesem abgelöst (Chi et al., 1996, Görlich et al., 1996c, Izaurralde et al., 1997). Der Importin-RanGTP-Komplex verläßt den Kern wieder und dissoziiert im Cytoplasma. Umgekehrt bilden Exportine einen trimeren Komplex aus Substrat und RanGTP im Zellkern, der im Cytoplasma in seine Bestandteile dissoziiert.

Der durch Adaptermoleküle vermittelte Transport von Substraten ist der zweite, kompliziertere Ran-vermittelte Transportmechanismus. Der am besten untersuchte Adapter Importinα bindet sein Substrat über das NLS und gleichzeitig den Transportrezeptor Importinβ im Cytoplasma. Importinβ vermittelt die Bindung an, sowie den Transport durch den NPC (Görlich et al., 1996a; Weis et al., 1996b) in den Kern.

Eine besondere Bedeutung bei Kernimport- und -exportprozessen fällt dem Protein RAN zu, das in einer GDP- und einer GTP-gebundenen Form vorkommt (Bischoff and Ponstingl, 1991b; Divas et al., 1990; Melchior et al., 1993a; Moore and Blobel, 1993). Der Übergang von RanGDP zu RanGTP wird durch den nukleären Austauschfaktor RCC1 (Bischoff and Ponstingl, 1991a; Ohtsubo et al., 1987) im Zellkern vermittelt, die Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP wird durch das RanGTPase-aktivierende Protein RanGAP1 (Bischoff et al., 1994)

und das Ran-bindende Protein RanBP1 (Beddow et al., 1995; Bischoff et al., 1995b; Coutavas et al., 1993) im Cytoplasma vorgenommen.

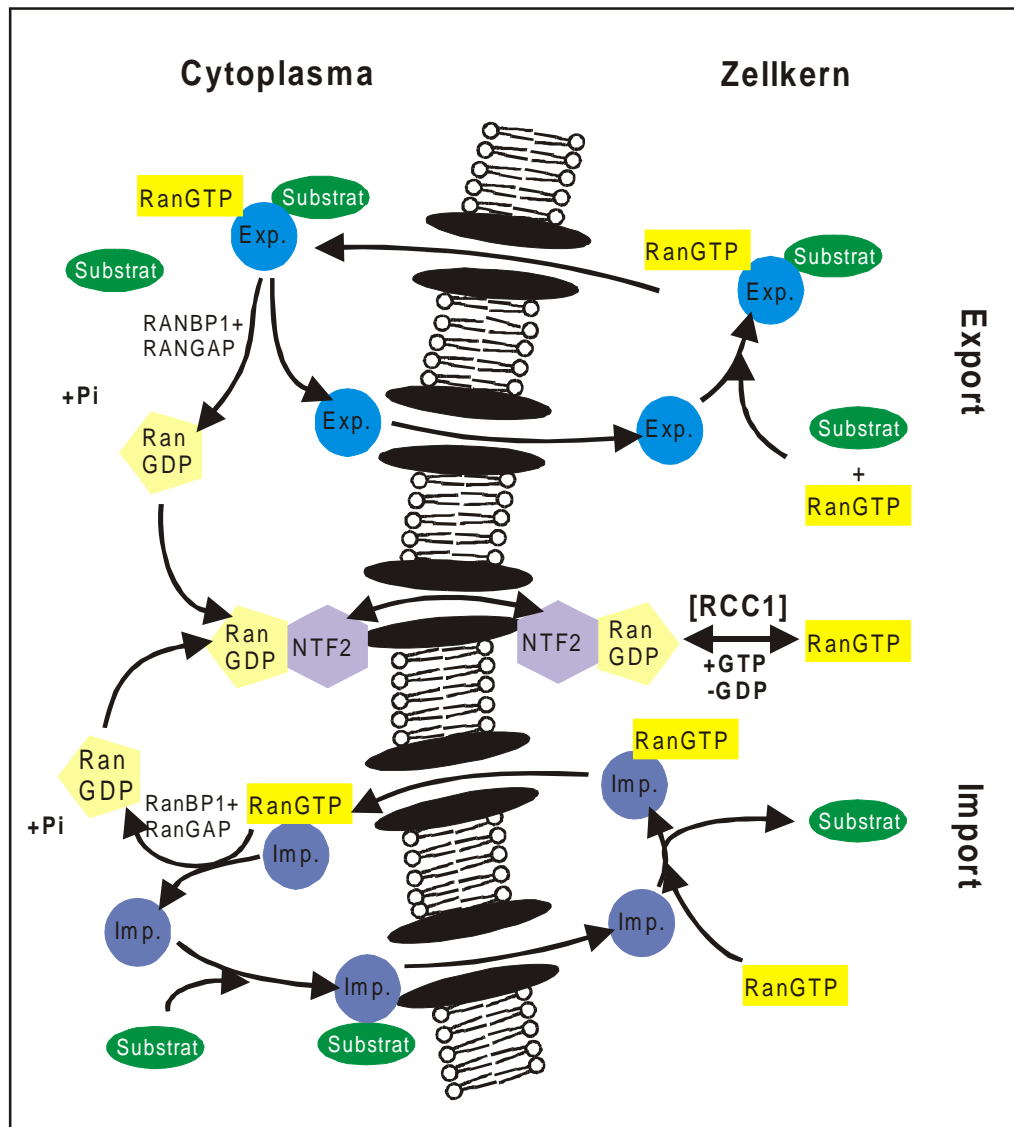


Abbildung 5: RanGTP-vermittelter Transport zwischen Zellkern und Cytoplasma durch Importine und Exportine

Die Entdeckung der als basisch charakterisierten Signalsequenzen NLS/NES, bestätigten die Vermutung, daß diesem Transport von Proteinen ein einheitlicher Mechanismus zugrunde liegt (Dingwall and Laskey, 1991). Die zur Zeit ca. 20 bekannten Kerntransportrezeptoren der Importin β -Superfamilie besitzen einige Gemeinsamkeiten. Diese sind die Importin β -N-terminale Bindungsdomäne, die ähnliche Größe von ca. 90-130kDa und ein saurer isoelektrischer Punkt von ca. 4.6-5.9 (Fornerod et al., 1997b; Görlich et al., 1997). Eine weitere Gemeinsamkeit dieser Proteinfamilie ist die hohe evolutionäre Konservierung von der Hefe *S. cerevisiae* bis zum Menschen.

1.5 Voraussetzungen und Ziele

Von unserer Arbeitsgruppe wurden vier ALL-Patienten identifiziert, die eine reziproke Translokation $t(5;14)(q34;q11)$ (Whitlock et al., 1994) aufwiesen. Jeweils zwei der Fälle wurden als prä-B-ALL bzw. T-ALL klassifiziert.

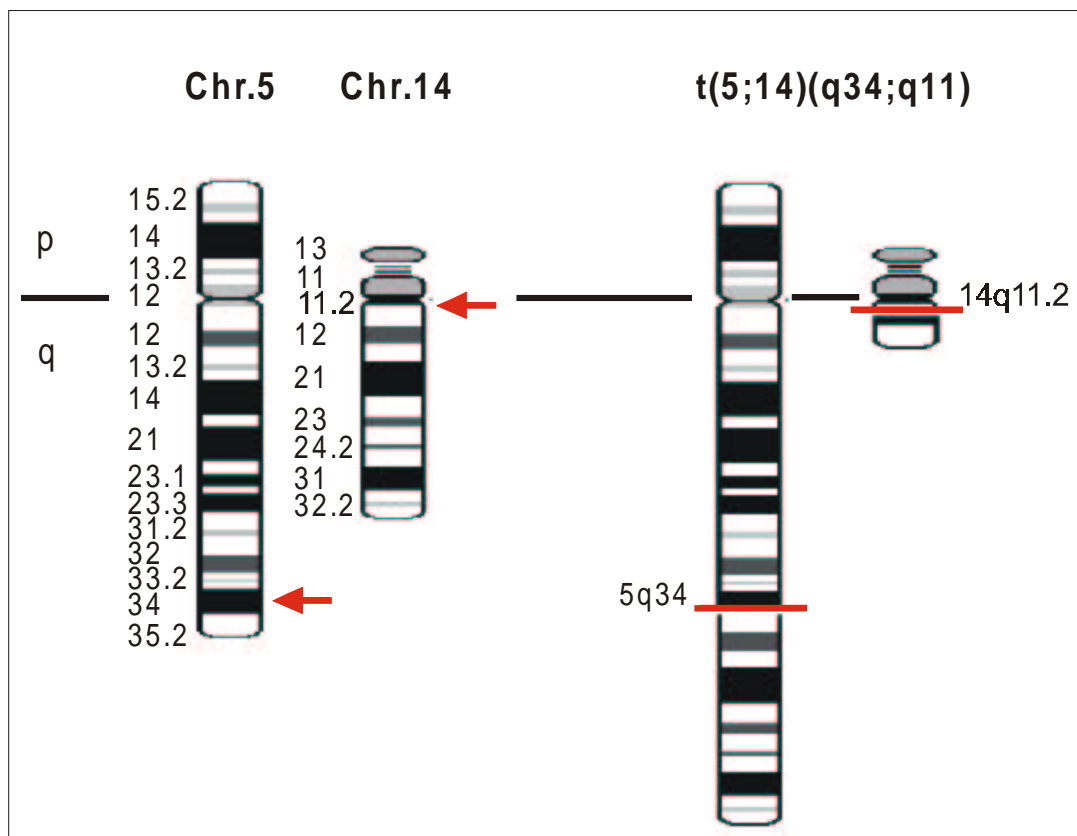


Abbildung 6: Translokation $t(5;14)(q34;q11)$ bei Patienten mit ALL

In allen vier Fällen konnte ein illegitimes $TCR\delta$ -Rearrangement festgestellt werden. Die Klonierung und Sequenzierung zweier $t(5;14)$ -Bruchpunkte identifizierte die Brüche auf 14q11 telomerwärts von $D\delta 2$. Zur Identifizierung kodierender DNA-Abschnitte auf Chromosom 5q34, wurde mittels genomischer P1-Klone, ein Exon-Trapping durchgeführt. Dabei wurden fünf Exone identifiziert, die durch eine EST-Datenbanksuche zu einem cDNA-Fragment von 1181bp zusammengestellt werden konnten. Eine cDNA-Datenbanksuche konnte dieses Fragment keinem bisher charakterisierten Gen zuordnen. Weiterhin wurde in Bruchpunktnähe die pseudogene Variante von *ubh-1* identifiziert, das für den pathogenen Mechanismus in ALL ausgeschlossen werden konnte (Hansen-Hagge et al., 1998).

Ausgehend von diesen Daten wurden für die vorgelegte Arbeit folgende Ziele formuliert.

Mittels RNA/DNA-analytischer Methoden soll das Expressionsmuster des auf Chromosom 5q34 identifizierten Gens aufgedeckt werden. Anhand der daraus resultierenden Daten und dem bereits erstellten cDNA-Fragment soll die komplette cDNA kloniert werden. Die exakte Lagebeziehung dieses Gens zu den klonierten Bruchpunkten zweier ALL-Patienten mit einer t(5;14) ist das zweite wesentliche Ziel dieser Doktorarbeit. Parallel dazu sollen Analysen der gewonnen cDNA und des Proteins seine Funktion sowie seine potentielle Rolle bei der ALL-Entstehung abklären helfen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterien (*E. coli*)

BL21: (DE3), *pLyseE*, *F*, *ompT*, (*r_B-m_B*), (*IDE3*), *Cm^r*
 BM25.8: *supE44 thi Δ(lac-proAB) [F⁻ traD36 proAB⁺ lacI^qZ ΔM15] λimm434 (Kan^r)P1*
 (Cam^r) *hsdR (r_{K12}-m_{K12}-)*
 C600: *ell14⁻(McrA⁻) supE44 thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21*
 NM522: *supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5 (r_K- m_K-) [F⁻proAB lacI^qZΔM15]*
 XL1blue: *recA1 endA1 gyrA96thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F⁻proAB lacI^qZΔM15Tn10*
 (*Tet^r*)]^c
 XL2blue: *MRF⁻: Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi recA1 gyrA96*
relA1 lac[F⁻proAB lacI^qZΔM15 Tn10(Tet^r) Amy Cam^r]^f
 Y1090r: *D(lac)U169 Δ(lon) AraD139 strA supF mcrA trpC22::Tn10(Tet^r)[pMC9 Amp^r Tet^r]*
mcrB hsdR

2.1.2 Bakteriophagen

λgt11
 λtriplEx2

2.1.3 Eukaryontische Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Zelllinie	Zelltyp
ACC42:	Adenoid cystisches Karzinom	Nalm-6:	akute lymphatische Leukämie
CTV-1:	akute myeloische Leukämie	NB-4:	akute promyelozytäre Leukämie
DAUDI:	Burkitt Lymphom	RAJI:	Burkitt Lymphom
HEL:	Erythroleukämie	RC ₂ A:	Myelom monozytäre Leukämie
HeLa:	Cervikal Karzinom	REH:	B-Zell Vorläufer Leukämie
HT-29:	Kolon Adenokarzinom	Sup-T13:	T-Zell Lymphom
K-562:	Chronisch myeloische Leukämie	T-24:	Blasenkarzinom
Karpas-299:	T-Zell Lymphom	THP-1:	Akute monozytische Leukämie
Kasumi-1:	akute myeloische Leukämie	U-937:	Myeloisch monozytäre Leukämie
KG-37:	akute myeloische Leukämie		
KMS-12:	Multiples Myelom		
KOPN:	B-Zell Vorläufer Leukämie		
MCF-7:	Adenokarzinom der Brust		
ML-2:	akute myelomonozytäre Leukämie		
Molt-4:	T-Zell Leukämie		
Mono-Mac-1:	akute monozytäre Leukämie		

Sämtliche Zelllinien wurden uns von Herrn Dr. Hans G. Drexler vom DSMZ in Braunschweig zur Verfügung gestellt.

2.1.4 Plasmide

1. pMOS-Vektor (Amersham Pharmacia)
2. pT7T3-Vektor (Amersham Pharmacia)
3. pUC18-Vektor (Amersham Pharmacia)
4. pUC19-Vektor (Amersham Pharmacia)
5. pUC57-Vektor (MBI Fermentas)
6. TOPO-Vektor (Invitrogen)

2.1.5 Enzyme

Restriktionsenzyme:

Die Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Roche/Boehringer Mannheim, Amersham Pharmacia, New England Biolabs und MBI bezogen.

Ligase: T4-Ligase (New England Biolabs, MBI)

Polymerasen:

1. T7-Polymerase (Amersham Pharmacia)
2. Taq-Polymerase (PerkinElmer, Roche/Boehringer Mannheim)
3. Pwo-Polymerase (Roche/Boehringer Mannheim)
4. KlenTaq-Polymerase (Clontech)

Phosphatase: Calf Intestine Phosphatase CIP (Roche/Boehringer Mannheim)

Reverse Transkriptase: Superscript Reverse Transkriptase (GIBCO/Life Technologies)

DNase und RNase:

1. RNase H (Merck)
2. DNase I (Merck)

Proteinase: Proteinase K (Merck)

2.1.6 Nukleotide

20mM dNTP's each (Amersham Pharmacia)

Die Nukleotidsequenzen von Oligonukleotiden (Primer) wurden nach Bedarf selbst zusammengestellt und von den Firmen MWG Biotech, Amersham Pharmacia und Interactiva synthetisiert.

2.1.7 Sequenzierprimer für Plasmide und Lambda-Phagen

2.1.7.1 Plasmid-Primer

1. M13forward-Primer: 5`-GTAAAACGACGGCCAGT-3`
(MBI Fermentas, Amersham Pharmacia)
2. M13reverse-Primer: 5`-CAGGAAACAGCTATGAC-3`
(MBI Fermentas, Amersham Pharmacia)
3. T7-Primer: 5`-TAATACGACTCACTAT-3`
(Amersham Pharmacia)

2.1.7.2 Lambda-Primer

Sense:

λ gt11 forward: 5`-ATTGGTGGCGACGACTCCTGGAG-3`
 λ gt11-5`: 5`-GCCATCGCCATCTGCTGCACGCG-3`

Antisense:

λ gt11 reverse: 5`-GTCTGGTTGACCATTACCATCGC-3`
 λ gt11-3`: 5`-CTGTGGTCTGGTTGACCATTACC-3`

2.1.7.3 Genspezifische *ranBP17*-Primer

Die aufgelisteten Primer sind in 5` → 3`-Orientierung dargestellt.

Sense-Primer:

M3Dfor: GCAGAGTTTGGCTGAATTGGAAGTG
Testis14for: GTCAGCCGAGTCAGTCCTTTACCTG
Sond500for: GATTATTCTAGACCTTCAGCAAAACACAGG
LD1for-700: CTTCCACCACTACTATCTCAG
H989for: TAACTCTGTGGCAAAGGATGGTAGCATCTG
G11for: GCATCTGTTCCTTTTGTGAAATCAACTGAACCCC
Matefor: CAGATGACAACCACGTTCTAGAGACG
LD2for-700: CTGGGGAAGATATGAGCCTG
Hito210s: CTAAATGACCTTTCTGTTGG
Hito306s: CCCTTTTCTTGGCATCAGTG
D3-1for: GTACCCAACGTACCTTC
Hito597s: GTACCCAACG
Hito665s: CTCCCATCTTGAACTTATGG
Hito707s: CCCAGCGTTTGAATTTTGATG
Hex1o: GTAATCAGATCCTGTCCCTTGGGAGCCTC
5`BamHit: TTTGACAATGTACTCCAGGC
LD3for-700: CTGTCAGTGTCCCACAGTGAC
Hito1071s: CATCATCAACTTAGAGCCTC
Hex2o: CTATCTCAGAGGGACTCACTACTCTT

Hex3o: CAGTTGTCTCCTCCAGCTGCTGTG
Hex4o: CATTTTATGCAGCAAACCCAGATGTCC
Hito1311s: GATGTCTGTCCTCATGAAC
Hito1476s: GTGCTTCAGAAACCTAATGG
Hex6o: CCTGTCCGTCAAGAACAGAGACAG
LD4for-700: CTCAGGACAGTGATGTTGGCTAG
Hito960s: CAAAGGATGTGTTTTTCAGTCTTTCT
4300for: GCTGTGAGCATTTAGAACGAGCC
Hito1252s: GAAGCACTACAGAGCATCCACAGG
Hito1615s: AGATTTTCAGAGGATGAGAAATAGCTGGTTTC

Alle mit Hito gekennzeichneten Primer sind mit dem Farbstoff Cy5 für die Sequenzierung auf dem ALF-Express markiert.

Antisense-Primer:

300rev: CATAACACTTCCAATTCAGCCAAACT
Testis14rev: CAGGTAAAGGACTGACTCGGCTGAC
M3Drev: GCAGTGTTCCACAGTACCCTGGAG
LD5rev-800: GTCTTTGAGAGAAGTATCACG
Sond950rev: CCCAGTGCTGTAGGCTAGTAATGG
LD4rev-800: GGCCTTCGTGATTTCTGG
H989rev: CTGCTGACCGTGCACAACTGCTCCAAC
Materev4: GACTTCTGACATACGAGCATATACCT
Materev5: CGTCTCTAGAACGTGGTTGTCATCTG
Hito232r: CCAACAGAAAGGTCATTTAG
3-1rev: AGTGTTCACTCGTGTGGTTTTTTAGCAT
Materev1: GGTGTTTCGACACCTGAAGTCGCTGAGAC
LD3rev-800: TCACCCAGATCTACCATCAG
Materev2: CTCTTGCCAGCCCGATCAACATACGC
Hito596r: TCCAGTCAAACAGCATGGTG
D3-1rev: GAAGGTACGTTGGGTAC
Hito647r: CATACCACCGTTCAACAGC
Hito685r: CAATAAGTTTCAAGATGGGAG
Hex1r: GAGGCTCCCAAGGGACAGGATCTGATTAC
Hito854r: ATGCCCTTGATGTTTCATTGG
Hex2r: AAGAGTAGTGAGTCCCTCTGAGATAG
Hex3r: CACAGCAGCTGGAGGAGACAACTG
LD2rev-800: CTATGTGCTTGAAGAGGTAGGTG
Hex4r: GGACATCTGGGTTTTGCTGCATAAAATG
Hito1369r: ATACTGACCACTGGTTCCG
Hito1535r: GCAACGCCTCTCTTGACGGA
Mux4r: CAACGCCTCTGCCACATCTCTTCTGA
3`EcoRIHit: TCAGCTCATCATGTGCGAGACTG
LD1rev-800: GGTGCAAACCTGGTTTATTACG
3500rev: CACACTTAGGTGCAAACCTGG
Mux3r: CCTTGACTGCACAACCATAAACTAGT
Mux2r: ATGGAGGCAGAGGACTGGGTGCTGGC
Mux1r: AGATTACAACAGGAGCCTGTGGATT

2.1.7.4 Primer für die Genomanalyse

PAC1for: GATCGGTTTGGCTGTAAGTATGTG
PAC2for: CGTGCCTGGCTTCCTAGGTATTT
PAC11rev6b: CAGAGTGAGACTCCATCTC
PAC11for7b: CCAATGATTATCCGGGAGCG
PAC6rev: ATTGCAGTGAGCCGAGATCACTG
PAC7for: AGGCTAAGGCAGGAGAATTGCTTGAG
TUF3rev: GTAATTCCAGCACTTTAGGAGGC
PAC5rev: AGCACTTTGGAAGGCCCAAGT
PAC4revb: GTGGCTCACACCTGTAATCCC
PAC6for: CTTAAACATGTTGTGATATAGCTAATG
TUF1rev: GAATTGCAGTAGCAGGTATTCC
PAC4rev: TGGGCAACAGAGCGAGACTGTCTC
PAC5forb: ATATAGGACAGCCATCCTAAC
PAC3rev: CGACATGGATGGAAGTGGAGAAG
PAC3bfor: CTTCTCCAGTTCCATCCATGTCG
PAC5for: ATTCCCAAGCCTCCTGGTTCCTG
PAC4for: GCATTTATTGCTATAAACTTCCTT
PAC2rev: GGGCAAATGACATGAATAGAC
PAC1rev: GGAACAGAATAGAGAGCCAG
PAC3for: GTGTCCTTGTCTGATATTGGTACC

2.1.8 DNA- und RNA-Größenmarker

DNA:	1. 100bp-Leiter	(Amersham Pharmacia)
	2. λ xHindIII-Marker	(Amersham Pharmacia)
	3. Molecular Weight Marker-XV	(Roche/Boehringer Mannheim)
	4. Molecular Weight Marker-VII	(Roche/Boehringer Mannheim)
RNA:	RNA-Molecular-Weight-Marker-II	(Roche/Boehringer Mannheim)

2.1.9 Immunglobuline

Primäre Antikörper:	1. Anti-Hit aus Kaninchen (mit Peptid RDVAEALRSDGNTEP von RanBP17 immunisiert und über Peptidsäule aufgereinigt): Dr. J. Pineda, Antikörper-Service, Berlin
	2. Anti-GST aus Maus: Santa Cruz SC-138
Sekundäre Antikörper:	1. Anti-Kaninchen aus Ziege: Biorad 170-6515
	2. Anti-Maus aus Ziege: Biorad 170-6516

2.1.10 Proteingrößenmarker

1. Sigma: 190-108-89-77-61-41-36 kDa
2. Biorad: 190-108-84-67-55-39-35 kDa

2.1.11 Flüssige Nährmedien für Bakterien

LB-Medium: 10 g Trypton
 5 g Hefeextrakt
 5 g NaCl
 ad 1L

2xYT-Medium: 16 g Trypton
 10 g Hefeextrakt
 1 g NaCl
 ad 1L

NZY⁺-Medium: 10 g NZ-Amin (Caseinhydrolysat)
 5 g Hefeextrakt
 5 g NaCl
 ad 1L

nach dem Autoklavieren wurde zu einer Endkonzentration hinzugegeben:

80 mM MgCl₂
80 mM MgSO₄
0.04 % Glukose sterilfiltriert (w/v)

TB-Medium: 12 g Trypton
 2.4 g Hefeextrakt
 ad 1L
 17 mM KH₂PO₄
 72 mM K₂HPO₄
 0.4 % Glycerin (v/v)

2.1.12 Nährplatten

LB-Platten: 10 g Trypton
 5 g Hefeextrakt
 5 g NaCl
 14 g Agar oder Agarose
 ad 1L

Additive: 100 µg/ml Ampicillin
 50 µg/ml Kanamycin-Sulfat
 15 µg/ml Tetracyclin
 34 µg/ml Chloramphenicol
 10 mM MgSO₄

Top-Agar/-Agarose: 10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
7 g Agar/Agarose
ad 1L

Additiv: 10 mM MgSO₄

2.1.13 Antibiotika

Stocklösungen:

100mg/ml Ampicillin (Sigma)
100mg/ml Kanamycin-Sulfat (Roche/Boehringer Mannheim)
15mg/ml Tetracyclin in 70% (v/v) EtOH (Sigma)
34mg/ml Chloramphenicol in 100% (v/v) EtOH (Roche/Boehringer Mannheim)

2.1.14 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Roth, Merck, Sigma, AppliChem, J.T. Baker und Amersham Pharmacia bezogen.

2.1.15 Kits

Klonierungen:

pMOSBlue T-Vector-Kit (Amersham Pharmacia)
T-Cloning Kit (MBI Fermentas)
TOPO Cloning Kit (Invitrogen)

Sequenzierungen:

1. AutoRead Sequencing Kit (27-1690-04/Amersham Pharmacia) → ALF-Express
2. Thermo SequenaseTM CyTM5 Dye Terminator Kit
(27-2682-01/Amersham Pharmacia) → ALF-Express
3. Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP
(RPN 2438/Amersham Pharmacia) → LICOR

Plasmid-Aufreinigung:

1. Qiawell 8 Plasmid Kit (Qiagen)
2. Qiaprep 8 Miniprep Kit (Qiagen)
3. Nucleobond Maxi Kit (Macherey und Nagel)
4. GFXTM Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Pharmacia)
5. Concert Nucleic Acid Purification System (GIBCO/Life Technologies)

DNA-Markierung:

³²P-QuickPrime Kit (Amersham Pharmacia)

Fragmentisolierung:

1. QiaEx II Gel Extraction Kit (Qiagen)
2. QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen)

PCR:

1. RACE-Kit (GIBCO/Life Technologies)
2. Marathon-ReadyTM cDNA Kit (Clontech)
3. AdvantageTM cDNA PCR Kit (Clontech)
4. ExpandTM Long Template PCR System (Roche/Boehringer Mannheim)

RNA-Aufreinigung:

1. Oligotex Direct mRNA Mini Kit (Qiagen)
2. Oligotex mRNA Midi Kit (Qiagen)

Protein-Detektion:

ECL-Western Blotting detection reagents (Amersham Pharmacia)

2.1.16 cDNA-Bibliotheken

1. Human Testis:	oligo dT und random synthetisiert	(Clontech)	HL3024b
2. Human Testis:	oligo dT synthetisiert	(GIBCO/Life Technologies)	10426-013
3. Human Testis:	oligo dT und random synthetisiert, mit LD-PCR amplifiziert	(Clontech)	HL5503u
4. Human Testis:	Marathon-Ready TM cDNA	(Clontech)	7414-1
5. Maus Testis:	oligo dT und random synthetisiert	(Clontech)	ML1020b
6. HeLa:	oligo dT und random synthetisiert	(Clontech)	HL5013b
7. Fibroblasten:	oligo dT und random synthetisiert	(Clontech)	HL1166b
8. Human foetal Leber:	oligo dT und random synthetisiert	(Clontech)	HL1064b
9. Human Pankreas:	oligo dT synthetisiert	(Clontech)	HL4049AH

2.1.17 Poly-A⁺-Northern Blots**Human Multiple Tissue Northern Blots von Clontech :**

1. 7760-1 H
2. 7759-1 H2
3. 7767-1 H3

Mouse Multiple Tissue Northern Blot von Clontech:

- 7762-1 M

2.1.18 Laborgeräte

Sequenziergeräte:	Alf-Express und Alf-ExpressII LICOR-4200E-2	(Amersham Pharmacia) (MWG)
Thermocycler:	PTC-200	(MJ RESEARCH)
Zentrifugen:	MicroMax Sepatech Varifuge 3.0R Kühlzentrifuge 5417R Sorvall RC-5B Sorvall OTD 55B	(IEC) (Heraeus) (Eppendorf) (Dupont Instruments) (Dupont Instruments)
Photometer:	Ultrospec 2000	(Amersham Pharmacia)
Elektroporator und Küvetten:	<i>E. coli</i> Pulser 4mm Küvetten 748040	(BioRad) (Biozym)
Wasserbäder:	1086 DC1	(GFL) (Haake)
Diverse Geräte:	Thermomixer 5436 pH-Meter Delta 320 Orbital Shaker Brutschränke Heizrührer MR 3002 UV-Stratalinker Curix 60 Entwickler CertoClav CV-EL 10	(Eppendorf) (Mettler) (Forma Scientific) (WTB Binder) (Heidolph) (Stratagene) (Agfa) (Kelomat)

2.1.19 Puffer und Lösungen

2.1.19.1 Proteinpuffer

SDS-PAGE-Puffer (5x):	0.125 M Tris 1.25 M Glycin 0.5 % SDS (v/v)
Western Blot-Puffer (10x):	38.6 mM Glycin 0.479 M Tris 0.037 % SDS (v/v)
Western Blot-Puffer (1x):	500 ml 10x Puffer 1 L Methanol ad 5L

Ponceau S-Färbelösung:	0.2 % (w/v) Ponceau S
	3 % (v/v) Trichloressigsäure in H ₂ O
Coomassie Blau-Färbelösung:	0.25 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau R250
	50 % (v/v) Methanol
	10 % (v/v) Essigsäure
	40 % (v/v) H ₂ O
Entfärbelösung für SDS-Polyacrylamid-Protein-Gele:	
	50 % (v/v) Methanol
	40 % (v/v) Essigsäure
	10 % (v/v) H ₂ O
Abschmelzpuffer für Western Blot:	2 % (w/v) SDS
	0.1 M β -Mercaptoethanol
	62.5 mM Tris/HCl pH 6.8
TBS/T-Puffer:	10 mM Tris/HCl pH 7.4
	0.15 M NaCl
	0.2 % (v/v) Tween-20
Protein (4x SDS-Puffer)	0.2 M Tris/HCl pH 6.8
	8 % (w/v) SDS
	0.4 % (w/v) Bromphenolblau
	40 % (v/v) Glycerin
	0.1 M DTT (frisch zugegeben)
NET/G-Puffer:	0.15 M NaCl
	5 mM EDTA
	50 mM Tris/HCl pH 7.5
	0.05 % (v/v) Triton X-100
	0.025 % (w/v) Gelatine

2.1.19.2 DNA-Puffer

DNA- Dephosphorylierungspuffer:	20 mM Tris/HCl pH 8.0
	1 mM MgCl ₂
	1 mM ZnCl ₂
Resuspensionspuffer: (für Plasmid-DNA)	50 mM Tris
	0.1 M EDTA pH 8.0
	100 µg/ml RNase H
Lysepuffer:	0.2 M NaOH
	1 % (w/v) SDS

Neutralisationspuffer:	3 M	Kaliumacetat pH 4.8
2xTSS-Puffer:	0.1 M	MgCl ₂
	20 % (w/v)	PEG 3350 in LB-Medium
TE-Puffer:	10 mM	Tris/HCl pH 8.0
	0.1 mM	EDTA
10x Ladepuffer:	0.25 % (w/v)	Bromphenolblau
	25 % (v/v)	Glycerin
	150 mM	EDTA
	1 % (w/v)	SDS
10x Lambda-Puffer:	1 M	NaCl
	0.1 M	MgSO ₄
	0.35 M	Tris/HCl pH 7.5
GYT für Elektroporation:	0.25 % (w/v)	Trypton
	0.125 % (w/v)	Hefeextrakt
	10 % (v/v)	Glycerin
10xTBE:	1.0 M	Tris
	0.83 M	Borsäure
	10 mM	EDTA
TENS-Puffer:	10 mM	Tris/HCl pH 8.0
	1 mM	EDTA
	0.1 M	NaOH
	0.5 % (w/v)	SDS
TES-Puffer:	0.1 M	Tris/HCl pH 8.0
	0.1 M	EDTA
	0.3 % (w/v)	SDS
Denaturierungs-Puffer:	0.5 M	NaOH
	1.5 M	NaCl
	pH > 13.0	
Neutralisierungs-Puffer:	0.5 M	Tris/HCl pH 7.0
	3 M	NaCl
Abschmelzlösung für DNA-Filter:	0.1 x	SSC
	1 % (w/v)	SDS

2.1.19.3 RNA-Puffer

GIT zur RNA-Isolierung:	4 M	Guanidinthiocyanat
	25 mM	Natrium-Citrat pH 7.0
	0.5 % (w/v)	N-Lauroylsarcosin
	0.1 M	β-Mercaptoethanol
10x RNA-Laufpuffer: (mit NaOH ad pH 7.0)	0.5 M	HEPES
	1 mM	EDTA
	50 mM	NaAcetat
RNA-Probenpuffer:	1 x	HEPES
	50 % (v/v)	Formamid (deionisiert)
	7.4 % (v/v)	Formaldehyd
5x RNA-Ladepuffer:	0.4 % (w/v)	Bromphenolblau/Xylencyanol
	50 % (v/v)	Glycerin
	0.1 M	NaH ₂ PO ₄ pH 7.0
1x RNA-Laufpuffer:	50 mM	HEPES
	1 mM	EDTA
	5 mM	Natriumacetat pH 7.0
Abschmelzlösung für RNA-Filter:	10 mM	Tris
	1 mM	EDTA
	1 % (w/v)	SDS
	80 % (v/v)	Formamid

2.1.19.4 Hybridisierungspuffer

20xSSC:	3 M	NaCl
	0.3 M	Natriumcitrat

Waschlösungen für Southern und Northern Blots (3x, 1x, 0,3x und 0.1xWaschlösung) wurden aus den entsprechenden Verdünnungen aus 20xSSC und SDS (jeweils 0.1% Endkonzentration), hergestellt.

Waschlösung 1 für Express-Hybridisierung:	2 x	SSC
	0.05 % (w/v)	SDS

Waschlösung 2 für Express-Hybridisierung:	0.1 x	SSC
	0.1 % (w/v)	SDS

Hybridisierungslösung:	1 x	Denhardts-Lösung (100x: 2% (w/v) Ficoll-400, 2% (w/v) BSA, 2% (w/v) Polyvinylpyrrolidon 360)
	100 g	Dextransulfat
	50 mg	Salm-DNA (ad 1L)
	1 % (w/v)	SDS
	3 x	SSC

2.2 Methoden

2.2.1 PCR

2.2.1.1 PCR mit Taq-Polymerase

Zur Synthese von DNA-Sonden wurde die PCR-Technik (Mullis et al., 1986) mit der thermostabilen Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Saiki et al., 1988) angewendet.

Ansatz:

Menge	Reagenz	Volumen
10x	PCR-Puffer (Perkin-Elmer)	5µl
20mM	each dNTP`s	0.5µl
10pmol/µl	Primer A	1-2µl
10pmol/µl	Primer B	1-2µl
5U/µl	AmpliTaq DNA-Polymerase	0.5µl
10-500 ng	Template-DNA	xµl
xµl	H ₂ O	ad 50µl

(die Volumina wurden für 100µl erhöht, wenn eine Isolierung des Amplifikates notwendig war)

Zyklus-Programm:

Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
2-3min.	94-96°C	1x
15-30sek.	94-96°C	20-40 x
30-45sek.	54-65°C	
1-2min.	72°C	
7min.	72°C	1x
∞	4°C	-

Die Möglichkeit einer Fehlpaarung der Primer mit der Template-DNA wurde durch Ansetzen der Reaktion auf Eis reduziert. Der gesamte Reaktionsansatz wurde daraufhin in die auf Denaturierungstemperatur vorgeheizte PCR-Maschine gestellt („vereinfachter Heißstart“). Bei der Amplifikation aus cDNA-Bibliotheken wurden zehn Zyklen mit einer Temperatur von

5-10°C über der Primer-Schmelztemperatur begonnen und anschließend mit der optimalen Primer-Schmelztemperatur fortgefahren.

Die Spezifität der PCR-Reaktionen ließ sich durch diese Verfahrensweise verbessern.

2.2.1.2 RT-PCR

Die Expression von Genen in Geweben oder Zelllinien wurde mittels RT-PCR untersucht. Die RNA wird dabei mit dem Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben und anschließend das erwünschte Fragment mittels PCR amplifiziert (Sambrook et al., 1989)

Ausgangsmaterial:

total RNA (5-20µg) oder polyA⁺-RNA (2-15µg)

Ansatz:

RNA			11 µl
+100pmol/µl Random Hexamere und 100pmol/µl			
oligo dT oder genspezifischer 100pmol/µl Primer			1 µl
10min. 70°C			
1min. Eis			
5	x	Reverse Transkriptase-Puffer	4 µl
0.1	M	DTT	2 µl
20	mM	dNTP`s each	0.5 µl
250	U/µl	RNase-Inhibitor	1 µl
200	U/µl	Superscript Reverse Transkriptase	1 µl
1-2h 37°C			
5min. 95°C			

1-2µl der cDNA-Reaktion wurden für die darauffolgende PCR (siehe oben) eingesetzt. Die angereicherte cDNA wurde entweder kloniert oder direkt in einer Sequenzreaktion eingesetzt.

2.2.1.3 5`-RACE-PCR

Die RACE-PCR (rapid amplification of cDNA ends) stellt eine Methode dar, bei der cDNA-Fragmente zwischen einer bekannten und einer unbekannten Sequenz amplifiziert werden können. Bei der 5`-RACE wird die mRNA mittels eines genspezifischen Primers in cDNA umgeschrieben und anschließend ein homopolymeres dCTP-Fragment an das 3`-Ende angehängt. Nach der Aufreinigung der PCR-Fragmente erfolgt die Amplifizierung der unbekannten cDNA-Sequenz durch einen genspezifischen und einen polyG-Primer. Zur Amplifizierung unbekannter 5`-cDNA-Bereiche wurde die RACE-Technik mittels Marathon-ReadyTMcDNA Kit (Clontech) und RACE-Kit (GIBCO/Life Technologies) eingesetzt.

2.2.1.4 Long Distance PCR

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten über 2kb wurde mit dem Enzymgemisch Taq- und Pwo-Polymerase von Roche/Boehringer Mannheim (Expand™ Long Template PCR System) durchgeführt. Die Mischung beider Enzyme ermöglicht die Amplifizierung von sehr langen DNA-Stücken. Außerdem wird durch die 5'-3'-Proofreading-Funktion der Pwo-Polymerase eine hohe Genauigkeit erzielt.

Mix1:

Menge	Reagenz	Volumen
20mM	dNTP's each	1µl
10pmol/µl	Primer A	1.5µl
10pmol/µl	Primer B	1.5µl
50-750ng	Template DNA	xµl
-	H ₂ O	xµl ad 50µl

Mix2:

Menge	Reagenz	Volumen
-	LongDistance Puffer (15mM MgCl ₂)	10µl
3.5U/µl	Taq/Pwo-Enzymmix	0.75µl
-	H ₂ O	39.25µl

Zyklus-Programm:

Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
3-5min.	94-96°C	1x
15-30sek.	94-96°C	20-40 Zyklen
30-45sek.	58-68°C	
2-8min.	68°C oder 72° +5sek./Zyklus	
1 min.	68°C oder 72°C	1x
∞	4°C	

2.2.2 DNA-Verdau

Der Restriktionsverdau von DNA wurde zur Analyse in 20-30µl, zur Präparation in 50-200µl Ansätzen durchgeführt.

In der Regel wurden dabei 1µg DNA mit 1-10U Enzym 1-4h bei 37°C in dem vom Hersteller angegebenen Reaktionspuffer inkubiert (SmaI bei 25°C). Die Restriktion von cDNA-Klonen in λ-DNA wurde ÜN durchgeführt, um eine vollständige Restriktion zu gewährleisten.

2.2.3 DNA-5'-Dephosphorylierung

Die 5'-Dephosphorylierung wurde eingesetzt, um das Religieren von Vektor-DNA-Enden zu verhindern, wenn dieser mit nur einem Restriktionsenzym behandelt worden war.

<u>50µl-Reaktion:</u>	20	mM	Tris/HCl pH 8.0
	1	mM	MgCl ₂
	1	mM	ZnCl ₂
	10-100	ng	Vektor-DNA
	0.1	U	CIP
	30	min.	37°C
	0.1	U	CIP
	30	min.	56°C
	10	mM	EDTA
	10	min.	75°C (Inaktivierung)

Die dephosphorylierten Vektoren wurden anschließend mittels Phenol/Chloroform aufgereinigt und mittels Ethanol präzipitiert.

2.2.4 Ligation

Die kovalente Verbindung zweier kohesiver (überlappender) oder zweier Blunt-End (glatter) DNA-Stücke wurde in einem Verhältnis von 0.1pM (Vektor) zu 0.3pM (Insert) DNA durchgeführt.

<u>Ansatz:</u>	x	µl	Vektor
	x	µl	Insert
	2	µl	T4 DNA-Ligase-Puffer
	1	µl	T4-Ligase (400U)
	x	µl	H ₂ O ad 20µl

Der Reaktionsansatz wurde ÜN bei 16°C (kohesiv) oder RT (Blunt-End) inkubiert.

2.2.5 Bakterientransformation

Die Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA wurde nach dem Protokoll von Chung et al. (1989) sowie mittels Elektroporation ausgeführt.

1. TSS-Transformation:

10ml einer logarithmisch wachsenden Bakterienkultur (OD_{600} : 0.4-0.8) wurden 5min. bei 4000g abzentrifugiert und in 500 μ l eiskaltem LB-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 450 μ l eiskaltem TSS und 50 μ l DMSO kompetent gemacht.

Zu 1-10 μ l (ca. 10-100ng) DNA wurden 200 μ l der kompetenten Bakterien gegeben und 30-60min. auf Eis inkubiert. Der ganze Ansatz wurde danach ohne weitere Inkubation auf die entsprechenden LB-Selektionsplatten ausgestrichen und ÜN bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2. Elektroporation:

Eine logarithmisch wachsende Bakterienkultur wurde nach 30minütiger Inkubation auf Eis 15min. bei 4000g abzentrifugiert und anschließend 2x mit dem halben Volumen 10%igem, eiskaltem Glycerin gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in 0.2% des Ausgangsvolumens mit eiskaltem GYT resuspendiert.

Zu 40 μ l der Bakterien wurden 10-100ng DNA zugegeben und vorsichtig gemischt.

Die DNA wurde durch einen Puls von 1.8kV in die Bakterien eingebracht. Nach Zugabe von 1ml LB-Medium wurden die Zellen 1h bei 37°C geschüttelt.

Von diesem Ansatz wurden 100 μ l auf LB-Selektionsplatten ausgestrichen und ÜN bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.2.6 DNA-Isolierung

1. Plasmide:

Die DNA-Plasmidaufreinigung wurde mit den angegebenen Kits durchgeführt.

Die Minipäparation von Plasmiden wurde außerdem nach einer Methode von Sheibani und Frazier (1997) durchgeführt.

Die Mini- und Maxipräparation von PAC-DNA wurde mittels Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt.

2. λ -DNA:

Zur Aufreinigung von λ -DNA wurde eine Methode mit Zinkchlorid als Präzipitationsagenz verwendet (Santos, 1991). Diese Methode gewährleistete eine hohe Ausbeute an DNA, die sich allerdings nur schlecht verdauen läßt (Neumann and Schairer, 1993). Aus diesem Grund wurde eine modifizierte Methode nach Su et al. (1998) verwendet.

Dabei wurden 50ml LB/10mM MgSO_4 /10% (w/v) Maltose mit 300 μ l einer Y1090r⁻ ÜNK angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0.5-0.9 bei 37°C inkubiert. Die Kultur wurde dann mit 100-300 μ l eines Phagenlysates (ca. 10^6 - 10^{10} pfu/ml) von einem einzigen Klon angeimpft und bei 39°C 3-16h inkubiert. Nach Erreichen einer deutlichen Lyse wurde die Kultur 10min. bei 4000g abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei 37°C mit DNaseI (10 μ g/ml) für 30min. und anschließend 5min. bei 37°C mit Zinkchlorid (40mM) inkubiert. Der Ansatz wurde bei 4000g für 5min. abzentrifugiert und danach in 700 μ l TENS-Puffer pro Milliliter Ausgangsvolumen resuspendiert. Zusätzlich wurde ProteinaseK hinzugefügt (100 μ g/ml) und die ganze Reaktion bei 65°C inkubiert. Es folgten zwei Phenol/Chloroformextraktionen.

Der Überstand wurde schließlich mit 0.7fachem Volumen Isopropanol präzipitiert, mit 70% EtOH gewaschen. Das DNA-Pellet wurde in 100-300 μ l 10mM Tris pH 8.0 resuspendiert.

3. PAC-DNA:

Die Isolierung von PAC-DNA erfolgte mittels einer alkalischen Lyse, anschließender Phenolextraktion und abschließender Ethanol-Präzipitation.

Dabei wurden 10ml ÜNK 15min. bei 4000g abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 180 μ l Puffer 1 (50mM Glukose, 25mM Tris/HCl pH 8.0, 10mM EDTA) resuspendiert. Nach Zugabe von Lysozym (2mg/ml) wurde der Ansatz 5min. auf Eis inkubiert und anschließend 400 μ l Puffer 2 (0.2M NaOH, 1% (w/v) SDS) hinzugegeben. Die Reaktion wurde 5min. auf Eis inkubiert und danach mit 300 μ l Puffer 3 versetzt. Nach 15minütiger Inkubation auf Eis wurde der Ansatz bei 12000g für 15min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 480 μ l 100%igem Isopropanol versetzt und 10min. bei 12000g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 μ l 10mM Tris pH 8.0 resuspendiert und 6 μ l 5M NaCl zugegeben. Es folgten zwei Phenol/Chloroform-Extraktionen.

Der wässrige Überstand wurde mit 2.5fachem Volumen 100% EtOH präzipitiert, das resultierende Pellet mit 70% EtOH gewaschen und schließlich in 50-100 μ l 10mM Tris pH 8.0 und 1 μ l RNaseH (10mg/ml) resuspendiert. Der Ansatz wurde 30-60min. bei 37°C inkubiert.

2.2.7 RNA-Isolierung

DNA-Sequenzen, die für Gene kodieren, dienen als Template für eine große Anzahl von RNA-Molekülen, die tRNA, rRNA und mRNA beinhalten. Die Mehrheit der RNA-Moleküle in einer Zelle wird dabei durch tRNA und rRNA gestellt. Die in dem Translationsprozeß als Template dienende mRNA stellt nur 1-5% der Gesamt-RNA einer Zelle dar.

Die Methoden der Phenol/Chloroform-, TRIZOL- und Cäsiumchlorid-Aufreinigung dienten der Präparation der Total-RNA, die wenn nötig mittels OligotexTM-mRNA-Kit von Qiagen, weiter aufgereinigt wurde.

Einige mRNA's wurden direkt aus dem Gewebe oder den eukaryontischen Zellen mittels OligotexTM-Direct-mRNA-Kit aufgereinigt.

Die mittels dieser Methoden aufgereinigten RNA's wurden für den Northern Blot, RT-PCR oder cDNA-Synthese eingesetzt.

1. Phenol/Chloroform-Aufreinigung:

Zur Isolierung von Total-RNA aus Zelllinien wurde eine Methode nach Chomczynski und Sachi (1987) über Phenol/Chloroformextraktion gewählt, die eine Denaturierung mit Guaninisoithiocyanat mit anschließender Phenol/Chloroform-Extraktion der RNA beinhaltet.

Dazu wurde zu 500µl in GIT aufgenommenen Zellen 50µl 3M Natriumacetat (pH 4.0), 500µl Phenol sowie 100µl Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) zugegeben.

Nach gutem Durchmischen des Ansatzes erfolgte eine Inkubation von mindestens 15min. auf Eis. Nach 30minütigem abzentrifugieren bei 12000g und 4°C wurde der Überstand abgenommen und mit 500µl Isopropanol 1-18h bei -20°C präzipitiert. Das durch 20minütige Zentrifugation bei 12000g und 4°C erhaltene Pellet wurde in 300µl GIT und 400µl Isopropanol aufgenommen und 1-4h bei -20°C präzipitiert und 30min. bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1ml 70%igem EtOH gewaschen und schließlich in DEPC-H₂O resuspendiert.

2. TRIZOLTM-Aufreinigung:

Die Aufreinigung von Total-RNA aus Geweben erfolgte durch das TRIZOLTM-Reagenz von GIBCO/Life Technologies. Dabei wurden 50-100mg Gewebe mit 1ml TRIZOL-Reagenz versetzt und durch pipettieren oder über eine Spritze homogenisiert. Der Ansatz wurde 5min. bei Raumtemperatur inkubiert und darauf mit 0.2ml Chloroform pro 1ml TRIZOL versetzt. Nach gutem Durchmischen und Inkubation für 2-3min. bei Raumtemperatur, wurde der ganze

Ansatz bei 4°C und 12000g für 15min. zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde für die weitere RNA-Isolierung eingesetzt. Aus der Interphase und der unteren organischen Phase wurde die genomische DNA und das Protein isoliert.

Die wässrige Phase mit der RNA wurde mit 0.5ml Isopropanol pro 1ml TRIZOL vermischt. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 10min. wurde die Lösung bei 4°C und 12000g für 10min. zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde mit 70% EtOH gewaschen und nach dem Trocknen bei RT in 10-50µl DEPC-H₂O bei 60°C für 10min. gelöst.

3. Cäsiumchlorid-Aufreinigung:

Zur Gewinnung von Total-RNA aus Zellen und Geweben wurde die Aufreinigung über ein Cäsiumchloridkissen erreicht.

50-100mg Gewebe bzw. 5-10x10⁶ eukaryontische Zellen wurden dabei in 6ml 4M GIT und 0.1M β-Mercaptoethanol (frisch zugegeben) mit einer Spritze homogenisiert.

Die lysierten Zellen wurden auf 4.25ml eines 5.7M Cäsiumchloridkissens in einem Zentrifugenröhrchen pipettiert und nötigenfalls mit 4M GIT/0.1M β-Mercaptoethanol auf 11ml aufgefüllt.

Der Ansatz wurde daraufhin mit dem Swingout-Rotor von Sorvall AH629 bei 24000rpm für 16-20h bei 4°C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das aus der Zentrifugation resultierende Pellet wurde in 800µl TES-Puffer aufgenommen.

Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion wurde der Überstand mit EtOH 30min. bei -20°C präzipitiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 70% EtOH gewaschen und nach dem Trocknen bei RT in 200-400µl DEPC-H₂O resuspendiert.

4. mRNA-Aufreinigung mittels OligotexTM-mRNA-Kits:

Die Aufreinigung von mRNA aus eukaryontischen Zellen erfolgte durch die OligotexTM-mRNA-Kits von Qiagen. Diese Methode basiert auf der Tatsache, daß die meisten eukaryontischen mRNA-Moleküle am 3'-Ende mit einem Homopolymer von 20-250 Adenosinnukleotiden enden. Die Isolierung dieser polyA⁺-RNA-Moleküle kann durch Hybridisierung dieser polyA⁺-Schwänze an oligo dT-Primer, die wiederum an Latex-Kügelchen gebunden sind, erfolgen. Diese unter Hochsalzbedingungen an die Latex-Kügelchen gebundene mRNA, kann nach Entfernung der tRNA und rRNA unter Niedrigsalzbedingungen von den Kügelchen wieder dissoziieren. Sämtliche Protokollschritte und Voluminaangaben wurden nach den Protokollen von Qiagen durchgeführt.

2.2.8 DNA-Fragmentisolierung

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten, die durch PCR oder Restriktionsverdau hergestellt worden waren, wurde der QiaEx II Gel Extraction Kit und die Aufreinigung mittels MikroSpin-Zentrifugenfilter von Roth verwendet. Bei beiden Anwendungen werden die DNA-Fragmente über Agarose-Gelelektrophorese vorgereinigt und aus dem Gel ausgeschnitten. Bei der Reinigung mit QiaEx II wurde nach dem vorgegebenen Protokoll vorgegangen.

Die Reinigung mittels MikroSpin-Säulen wurde wie folgt durchgeführt:

Das ausgeschnittene Gelstück wurde durch die Filtereinheit 30min. abzentrifugiert. Die so erhaltene DNA-Suspension wurde 1-2x einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen. Die DNA im Überstand wurde mittels Ethanol oder Isopropanol präzipitiert und mit 70% EtOH gewaschen und in 10-30µl TE-Puffer resuspendiert. Die gereinigte DNA wurde daraufhin in einem Agarose-Gel überprüft.

2.2.9 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Visualisierung, Auftrennung und Präparation von Nukleinsäuren wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet (McDonell et al., 1977; Southern, 1979).

DNA:

Gelansatz:

	0.3-2.0 % (w/v)	Agarose (40kb-100bp DNA-Fragmente)
	1 x	TBE
	0.5 µg/ml	Ethidiumbromid
Spannung:	30-130	V
Elektrophoresepuffer:	1x	TBE

Der DNA (0.1-5µg) wurde 5x DNA-Ladepuffer zugegeben.

RNA:

Bei der Gelelektrophorese für RNA wurden die Lösungen mit 0.1% DEPC (Endkonzentration) behandelt. Durch kovalente Bindung von DEPC an RNasen, werden diese inaktiv (Fedorcsak et al., 1969). Dabei wird DEPC in Lösung gebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch Autoklavieren wurde das DEPC inaktiviert.

Gelansatz:

	1 % (w/v)	Agarose
	1 x	HEPES (50mM HEPES, 1mM EDTA, 5mM Natriumacetat pH 7.0)
	7.4 % (v/v)	Formaldehyd

Spannung: 80-100V
Elektrophoresepuffer: 1 x HEPES (50mM HEPES, 1mM EDTA, 5mM Natriumacetat pH 7.0)
7.4 % (v/v) Formaldehyd

Die aus Gewebe oder Zellen gewonnene RNA wurde nach Einkonzentrierung in der Speed-Vac in 20µl Probenpuffer resuspendiert und 10min. bei 68°C denaturiert. Anschließend wurden 1µl Ethidiumbromid (1mg/ml) und 5µl 5x RNA-Probenpuffer zugegeben.

2.2.10 Southern Blotting

Die Übertragung von DNA aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran wurde mittels kapillarem Transfer (Southern, 1975) in einem Hochsalzpuffer (Khandjian, 1987) durchgeführt. Das Agarosegel wurde vor dem Transfer je 1h in:

Denaturierungspuffer
Neutralisierungspuffer
kurz in 3x SSC inkubiert.

Nach Durchfeuchtung von Nylonfilter und Whatman-Papier wurde folgender Aufbau durchgeführt:

3 x	Whatman3MM in 20x SSC-Reservoir
1 x	Agarosegel
1 x	Nylonmembran (Hybond-XL)
4 x	Whatman3MM
ca. 10 cm	Papiertücher (trocken)
	Glasplatte
ca. 800 g	Gewichte
Bottingzeit: 16-18h	

Die Nylonmembran wurde nach dem Transfer 2h bei 80°C gebacken und unter UV-Strahlung gecrosslinkt. Die DNA wurde dadurch irreversibel an die Nylonmembran kovalent gebunden.

2.2.11 Northern Blotting

Die Übertragung von RNA aus einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel (Lehrach et al., 1977) auf eine Nylonmembran wurde äquivalent zum Southern Blotting nach Alwine et al. (1977) durchgeführt. Sämtliche Lösungen wurden dabei mit DEPC behandelt.

Vor dem Transfer wurde das Gel wie folgt behandelt:

30min.	in H ₂ O (3x gewechselt)
40min.	in 20x SSC (1x gewechselt)
20min.	in 10x SSC (1x gewechselt)

Der Blot-Aufbau, die Blot-Zeit und die Bindung an die Nylonmembran wurden dem Southern Blot entsprechend durchgeführt.

2.2.12 Screening von cDNA-Bibliotheken

2.2.12.1 Bakteriophagenbibliotheken

Die verwendeten Bibliotheken hatten die Bakteriophagen λ gt11 und λ triplEx2 als Vektoren, die sich wiederum in dem *E. coli* Stämmen Y1090^r und XL1 als Wirt vermehren. Die verwendeten Bibliotheken wiesen eine Anzahl von $1.0\text{-}5.0 \times 10^6$ unabhängigen Klonen auf.

Für eine erfolgreiche Infektion mit λ gt11 und λ triplEx2 wurden logarithmisch wachsende Bakterienkulturen (Y1090^r für λ gt11 und XL1-Blue für λ triplEx2) in LB-Medium mit 10mM MgSO₄ und 0.2% (w/v) Maltose verwendet. Bei einer optischen Dichte von 2 wurden die Bakterien in der Hälfte ihres Ausgangsvolumens mit 10mM MgSO₄ resuspendiert. Je nach Phagentiter wurden 1-100 μ l Bakteriophagen dabei 15min. mit 1ml (für 24x24cm Platten) oder 200 μ l (für 90mm Platten) Bakterien bei 37°C inkubiert. Für 90mm LB-Platten bzw. 24x24cm Platten wurden 3ml bzw. 25ml auf 48°C erwärmte Top-Agarose (+10mM MgSO₄) zu der Phagensuspension hinzugefügt und auf 37°C erwärmte LB-Platten gegeben.

Zur Ausplattierung der korrekten Anzahl von Phagenklonen wurde zuerst eine Titerbestimmung der verwendeten Bibliothek auf 90mm LB-Platten durchgeführt.

Dazu wurden 2-10 μ l des Bibliothekenstocks 1:100 in 1x-Lambdapuffer verdünnt. Diese Verdünnung wurde nochmals in 1x-Lambdapuffer 1:1000 verdünnt. Von dieser 1:100.000 Verdünnung wurden 0, 5, 10 und 20 μ l mit 100 μ l jeweils 1x Lambdapuffer sowie 200 μ l einer Bakterien-ÜNK 15min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 3ml 45°C warmem Top-Agar/10mM MgSO₄ vermischt und auf 90mm LB-Platten verteilt. Nach einer Zeit von 4-6h wurden die Phagenplaques sichtbar und ermöglichten eine Berechnung des Phagentiters nach der folgenden Gleichung:

$$\frac{\text{Anzahl der Plaques} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^3 \mu\text{l/ml}}{\mu\text{l der plattierten Phagenverdünnung}} = \text{pfu/ml}$$

Durch diese Berechnung konnten auf sechs 24x24cm LB-Platten 350.000- 400.000pfu/Platte sehr genau ausplattiert werden.

Nach einer Inkubation von ca. 4-6h bei 37°C für λ gt11 und bei 41°C für λ triplEx2 war eine eindeutige Plaquebildung sichtbar. Durch Lagerung bei 4°C über Nacht wurde eine feste Ver-

bindung der Top-Agaroseschicht mit dem Agar gewährleistet.

Die Phagenplaques wurden am folgenden Tag zweimal pro Platte auf Nylonmembranen übertragen. Dabei wurden die Membranen 5min. auf den Bibliotheksplatten belassen. Für eine spätere Orientierung der Filter bzw. der Autoradiogramme wurden diese mit einer Kanüle bis in den Agar assymmetrisch mehrmals durchstoßen. Die daraufhin abgezogenen Filter wurden wie folgt behandelt: 5min. Denaturierungspuffer- 5min. Neutralisierungspuffer- 5min. 3xSSC. Die Phagenhülle wird durch diese Behandlung zerstört und gewaschen. Die cDNA wird denaturiert und bleibt am Filter haften.

Die auf die Nylonmembranen übertragene DNA wurde durch UV-Bestrahlung in einem UV-Crosslinker und durch darauffolgendes Backen bei 80°C für 2h kovalent gebunden.

Nach der Hybridisierung der Filter und der Exponierung der Röntgenfilme bei -80°C, konnten die positiven Signale mittels der von den Nylonmembranen übertragenen Markierungen den jeweiligen Platten korrekt zugeordnet werden.

Die auf dem Röntgenfilm als schwarze Punkte sichtbaren Klone konnten dadurch mit dem breiten Ende einer Pasteurpipette aus den LB-Agarplatten ausgestochen werden. Es erfolgte die Elution der Phagen aus diesem Agarstück durch Inkubation in 1ml (λ gt11) oder 350 μ l 1xLambdapuffer (λ triplEx2) bei 37°C/225rpm für 3h oder bei RT/225rpm ÜN. Die eluierten Phagenuspensionen wurden 1:100 verdünnt und davon 1-10 μ l für das 1. Rescreening nach der gleichen Vorgehensweise wie bei der Titerbestimmung ausplattiert. Die Übertragung der Plaques wurde dafür nur einmal auf runde 82mm Nylonfilter (Hybond RPN 82S) vorgenommen. Nach der Hybridisierung und Exposition wurden die positiven Signale auf die Agarplatten übertragen und die Phagen mit dem breiten Ende einer Pasteurpipette ausgestochen. Dieses Verfahren wurde insgesamt dreimal wiederholt bis ein einziger positiver Phagenklon gepickt werden konnte. Die DNA dieses Klonen wurde isoliert und sein cDNA-Insert mittels Restriktionsverdau oder PCR in einen Plasmidvektor kloniert und durch Sequenzierung analysiert.

2.2.12.2 Bakterienbibliotheken

Der verwendeten humanen Testisbibliothek von GIBCO/Life Technologies diente das Plasmid pCMV-SPORT als Vektor, das sich in dem *E. coli*-Stamm DH12STM vermehrt. Die Bibliothek hatte eine Anzahl von 1x10⁷ unabhängigen Klonen.

Die Titerbestimmung wurde auf 90mm LB/Ampicillin-Platten durchgeführt. Dazu wurden 2µl des Bibliothekenstocks 1:250000 verdünnt und davon 0, 1, 10 und 20µl mit 200µl LB-Medium auf LB/Amp-Selektionsplatten ausgestrichen. Nach einer Inkubation bei 37°C für ca. 8-10h wurden die Kolonien sichtbar und konnten gezählt werden. Die Berechnung des Titers erfolgte wie bei den Bakteriophagenbibliotheken.

Mit einer Koloniedichte von 200.000-300.000cfu/Platte wurde auf sieben 24x24cm LB/Ampicillin-Platten, die mit einer Nylonmembran bedeckt waren, ausplattiert. Für eine gleichmäßige Verteilung der Bakterien auf der Platte wurden 15ml flüssiges LB/Ampicillin hinzugefügt, so daß sich die Suspension sofort auf der ganzen Platte verteilt hat. Die Platten wurden bei 37°C ca. 8-10h oder bei 30°C ÜN inkubiert, bis die Kolonien gerade sichtbar wurden. Die Kolonien wurden daraufhin auf zwei Nylonmembran pro Platte repliziert, die wiederum auf LB/Ampicillin-Platten gelegt wurden. Die Membranen wurden nach der Markierung mit einer Kanüle von den Platten abgezogen und wie bei den Bakteriophagenmembranen beschrieben, entsprechend behandelt. Die „Tochterplatten“ wurden ca. 1h bei 37°C inkubiert, bis die Kolonien deutlich sichtbar wurden.

Die Hybridisierung, Exponierung und Rescreenings erfolgten entsprechend der Vorgehensweise bei Bakteriophagen. Für die Rescreenings wurden die Bakterien mittels einer Impfpöse von den Platten geschabt und in 1ml LB-Medium aufgenommen. Diese wurden nach der 1:100 Verdünnung in LB-Medium mit 1, 5 und 10µl auf 90mm LB/Amp-Platten mit Nylonfiltern ausplattiert und erneut hybridisiert. Nach drei Runden von Rescreenings konnte eine einzelne Kolonie gepickt werden, von der die DNA isoliert und direkt sequenziert werden konnte.

2.2.12.3 Konvertierung von λtriplEx2 in ptriplEx2

Der Bakteriophage λtriplEx2 flankiert über zwei loxP-Erkennungssequenzen für die Cre-Rekombinase das Plasmid ptriplEx2. Dieses Plasmid kann durch den *E. coli*-Stamm BM25.8 bei einer Temperatur von 31°C durch die Cre-Rekombinase freigesetzt werden. Die Aufreinigung von Phagen-DNA entfällt dadurch.

Der Stamm BM25.8 wurde in LB/10mM MgSO₄ bei 31°C und 150rpm ÜN geschüttelt. Nach der Zugabe von 10mM MgSO₄ Endkonzentration wurden 150µl einer λtriplEx2-Phagensuspension zu 200µl kompetenter BM25.8 gegeben. Es folgte eine Inkubation für 30min. bei 31°C und nach Zugabe von 400µl LB eine Inkubation für 1h bei 31°C/225rpm.

Von der infizierten Zellsuspension wurden 1-10µl zu 200µl LB-Medium gegeben, auf LB/Amp-Platten ausgestrichen und ÜN bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Nach einer Plasmid-DNA-Aufreinigung und einem Restriktionsverdau folgte die Sequenzierung.

2.2.13 Radioaktive Hybridisierung

Die Hybridisierung von Southern/Northern Blots sowie von auf Nylonmembranen übertragenen cDNA-Bibliotheken wurde in Anlehnung nach einem Protokoll von Denhardt (1966) bzw. Gillespie und Spiegelman (1965) durchgeführt. Zur radioaktiven Markierung von DNA-Sonden wurde ^{32}P in Form von $\alpha\text{-}^{32}\text{PdCTP}$ (10mCi/ml; spezifische Aktivität 3000Ci/mmol) verwendet. Die eingesetzten DNA-Sonden hatten eine Länge von 200-1500bp. Je nach Größe und Art der zu hybridisierenden Membran wurden 1-15ng Sonde/ml Hybridisierungslösung verwendet. Die Southern und Northern Blots wurden mit sonifizierter Salm- oder Buffy-Coat-DNA, cDNA-Membranen mit sonifizierter *E. coli*-DNA (jeweils 0.5-1.5µg), 3-6h bei 63°C prähybridisiert.

Radioaktives Markieren und Reinigen von DNA

x µl	DNA
x µl	H ₂ O ad 30-39µl
10 min.	95°C
+ 10 µl	Reagent Mix (^{32}P QuickPrime Kit) → Eis
+ 1-2 µl	T7-Polymerase (8-10U/µl)
+ 1-10 µl	$\alpha\text{-}^{32}\text{PdCTP}$
gesamt 50 µl	Reaktion
15 min.	37°C

Die radioaktiv markierte Sonde wurde über eine Sephadex G50-Säule von nicht eingebauter Radioaktivität gereinigt.

Direkt vor der Zugabe in die Hybridisierungslösung erfolgte die Denaturierung der markierten Sonde für 10min. bei 95°C und anschließender Inkubation auf Eis.

Hybridisierung

Die radioaktiv markierte Sonde wurde zur Prähybridisierungslösung gegeben, nachdem die Membranen entfernt wurden. Durch langsames Schwenken der Hybridisierungslösung wurde eine gleichmäßige Verteilung der Sonde gewährleistet. Anschließend wurden die Membranen unter Ausschluß von Luftblasen zu der radioaktiven Lösung gegeben. Die Hybridisierung wurde 16-20h bei 63°C durchgeführt.

Waschen

Die Membranen wurden dreimal für 20-30min. mit 3x Waschlösung und je nach verbleibender Radioaktivität auf den Membranen, dreimal mit 1x, 0.3x, 0.1x Waschlösung bei 63°C gewaschen.

Nach Einschweißen der Membranen in Schlauchfolie erfolgte eine Exposition mit 10fach verstärkenden Hyperscreens von 1-14 Tagen auf Kodak DS oder XA-R bei -80°C.

2.2.14 DNA-Sequenzierung

Die DNA Sequenzanalyse wurde auf der Basis der Didesoxymethode nach Sanger (1977) durchgeführt. Diese Methode basiert auf der Tatsache, daß ein Didesoxynukleotid, dem die freie OH-Gruppe am 3'-Ende fehlt, in einer DNA-Kettenverlängerungsreaktion zum Abbruch führt. Die durch die Enzyme T7-Polymerase und Sequenase vermittelte Kettenverlängerungsreaktion wird in die Schritte Primer-Annealing/DNA-Extension/Kettenabbruch und Stop-Reaktion unterteilt. Der an das DNA-Template gebundene Primer wird durch das Enzym und Desoxynukleotide verlängert. Durch das richtige Verhältnis von Didesoxynukleotiden zu Desoxynukleotiden wird gewährleistet, daß DNA-Fragmente in einem Bereich von ca. 30-1500bp entstehen, die sich in der Länge um nur eine Base unterscheiden. Die Farbstoffe Cy5 (AutoRead-Kit und Dye-Terminator für ALF-Express) oder IRD700/800 (Thermo-Sequenase-Kit für LICOR) werden in die entstandenen DNA-Fragmente integriert. Treffen diese DNA-Fragmente durch die elektrophoretische Auftrennung mittels eines Acrylamidgels auf den Laser des Sequenziergerätes, wird der entsprechende Farbstoff zur Fluoreszenzemittierung angeregt, die an den Computer weitergeleitet wird. Die zeitliche Abfolge der auf den Laser treffenden Fragmente ermöglicht die Bestimmung der korrekten Basenabfolge in einem DNA-Molekül. Die Sequenzierung von Plasmid-, PAC- und λ -DNA wurde mit den angegebenen Kits und den damit verbundenen Protokollen durchgeführt.

2.2.14.1 Sequenzreaktion für LICOR

Die Sequenzierung auf dem LICOR-4200E-2 erfolgte ausschließlich durch eine Cycle-Sequencing-Reaktion mit Thermo-Sequenase. Dafür wurden Oligonukleotide verwendet, die mit den fluoreszierenden Farbstoffen IRD700 oder IRD800 markiert waren. Die Besonderheit des LICOR besteht in der Detektierung zweier verschiedener Wellenlängen in der gleichen

Spur, so daß in einem Reaktionsgefäß zwei verschiedene Sequenzreaktionen mit den Farbstoffen IRD700 und IRD800 eingesetzt werden konnten und somit der Durchsatz verdoppelt wurde.

DNA/Primer-Mix:

x µl	DNA	(100ng/1kb)
1 µl	Primer A	
1 µl	Primer B	
3 µl	DMSO	
x µl	H ₂ O	ad 21µl

Von dem DNA/Primer-Mix wurden jeweils 4.5µl zu 1.5µl der A-/C-/G- und T-Terminationsmische gegeben.

Sequenzierprogramm:

Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
2min.	95°C	1 x
15sek.	95°C	25-35 x
30sek.	x°C (T _m des Primers)	
90sek.	65°C	
∞	4°C	

Nach der Reaktion wurden 6µl Stopppuffer zugegeben, die DNA 3min. bei 70°C denaturiert und anschließend 1-2µl auf das Sequenziergel aufgetragen.

2.2.14.2 Sequenzreaktion für ALF-Express

Die Sequenzierung auf dem ALF-Express wurde vorwiegend mit unmarkierten Primern durchgeführt, die erst in der Sequenzreaktion mit dem Farbstoff Cy5 markiert wurden.

Ansatz:

DNA-Denaturierung:	8 µl	DNA (4-6µg)
	2 µl	Primer (10pm/µl)
	1 µl	NaOH (1M)
	5 min.	65°C → 5min 37°C
Primer-Annealing:	1 µl	HCl (1M)
	2 µl	Annealing-Puffer
	1 µl	Labelling-Mix (10mM Cy5-dATP, je 1mM dCTP, dGTP, dTTP)
Kettenverlängerung:	2 µl	T7-Polymerase (8U/µl; 1:1 mit H ₂ O verdünnt)
	5 min.	37°C
	1 µl	Extensions-Puffer
	3 µl	DMSO

Jeweils 4.5µl der Reaktion wurden zu 2.5µl der A-/C-/G- und T-Terminationsmische gegeben. Nach einer Inkubation von 5min. bei 37°C wurde die Reaktion mit 5µl Stopplösung beendet.

Die Denaturierung der DNA erfolgte bei 80°C für 3min.. Daraufhin wurden 5-6µl auf das Gel aufgetragen.

Sequenzierung von PAC-DNA

Aufgrund der Größe von PAC-DNA (-250kb) wurde diese ausschließlich mit dem Dye-Terminations-Kit über ein Cycle-Sequencing Protokoll sequenziert.

4 x Nukleotid-Mixe: 4 µl dNTP (A/C/G und T)
2 µl Cy5-ddNTP
14 µl H₂O
2 µl EDTA (0.55mM)

Die so angesetzten Nukleotidmixe waren für zehn Sequenzreaktionen ausgelegt. Jeweils 2µl dieser Mixe wurden auf die PCR-Gefäße verteilt.

DNA/Primer-Mix: 1-20.5µl PAC-DNA (5-7µg)
2 µl Primer
3.5 µl Reaktion-Puffer
0-19.5 µl H₂O
1 µl Thermo-Sequenase

Jeweils 6µl dieses Ansatzes wurde zu den A-/C-/G- und T-Terminationmischen gegeben.

Sequenzierprogramm:

Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
2min.	95°C	1 x
30sek.	95°C	35-40 x
30sek.	3°C unter T _m des	
90sek.	72°C	
∞	4°C	

Nach der Sequenzierung wurde jede Reaktion mit 7.5M Ammonium-Acetat und 2µl Glycogen gefällt und danach mit 70% EtOH gewaschen. Nach Resuspension in 8µl Stop-Lösung wurden 4µl auf ein 0.3mm ALF-Gel aufgetragen.

Gel für ALF (0.5mm):

29 g Harnstoff
8.8 ml Hydrolink Long-Ranger Gellösung (FMC) oder Page Plus Concentrate (Amresco) jeweils 40%
(Acrylamid:Bisacrylamid, 19:1)
ad 60 ml H₂O

Unter Zugabe von einem Teelöffel Amberlite IRN-150L (Amersham Pharmacia) wurde der Ansatz 30min. langsam gerührt. Der deionisierte Gelansatz wurde mit 12ml 10xTBE und 8ml H₂O mittels Vakuum durch einen 45µm Nylonfilter filtriert und entgast. Nach Zugabe von 300µl 10% APS und 30µl TEMED wurde die Lösung über eine 50-60ml Spritze zwischen die zwei Glasplatten gegeben und für mindestens 90min. bei Raumtemperatur polymerisiert. Für 0.3mm Gele wurden 60ml Gellösung angesetzt. Desweiteren wurde ReproGel™ LongRead von Amersham/Pharmacia verwendet, das nach Mischen der beiden Komponenten, über Bestrahlung mit UV-Licht innerhalb von 10-12min. polymerisiert. Die Laufbedingungen für ein 25cm langes und 0.3 oder 0.5mm dickes ALF-Gel waren:

1500 V
60 mA
25 W
55 °C
700-900 min.

Gel für LICOR (0.2mm):

25.2 g Harnstoff
4.5 ml Hydrolink Long-Ranger Gellösung
(40%; Acrylamid:Bisacrylamid, 19:1)
6 ml 10xTBE
ad 60 ml H₂O

Der Ansatz wurde für 15-20min. gerührt und daraufhin ca. 5-10min. entgast. Nach Zugabe von 400µl 10% (w/v) APS und 40µl TEMED wurde der Ansatz mit Hilfe einer 60ml Spritze zwischen die beiden Platten injiziert und mindestens 60min. bei Raumtemperatur polymerisiert. Die Laufbedingungen für ein 66cm langes und 0.2mm dickes LICOR-Gel waren bei 30 Frames:

3000 V
30 mA
75 W
45 °C

2.2.15 Induktion eines GST-Fusionsproteins

Die Induktion eines GST-RanBP17-Fusionsproteins mit dem Plasmid pGEX-2T wurde in dem Bakterienstamm BL21 durchgeführt, in welchem der Proteinabbau durch die nicht exprimierten lon-/pron-Proteasen deutlich reduziert ist. Die pGEX-Plasmide beinhalten vor der Poly-linkerregion die Sequenz für die Glutathion-S-Transferase (Smith and Johnson,

1988). Diese wird zusammen mit einer im richtigen Leserahmen klonierten cDNA, nach Induktion mit IPTG, in *E. coli* als GST-Fusionsprotein exprimiert und kann durch Bindung an Glutathion-Sepharose aufgereinigt werden.

Hierzu wurden BL21-Zellen mit einem GST-cDNA-Hybridplasmid transformiert. 1/10 einer ÜNK wurde in 2xYT/2% Glukose/Ampicillin verdünnt und ca. 2h bei 37°C inkubiert. Die Induktion der Proteinsynthese wurde danach mit 0.5-1mM IPTG und Inkubation von 3-5h bei 37°C erreicht. Die Bakterien wurden 2min. abzentrifugiert und in 50-100µl 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Analyse erfolgte nach 10min. bei 95°C auf einem SDS-PAGE.

2.2.16 SDS-PAGE

Die diskontinuierliche Proteingelelektrophorese wurde nach einem Protokoll von Laemmli (1970) durchgeführt. In der diskontinuierlichen Gelelektrophorese werden Proteine in einem Sammelgel, das 5% Acrylamid enthielt, zu einer Bande konzentriert. In dem Trenngel, das 10% Acrylamid enthielt, werden die Proteine aufgrund ihrer molekularen Größe aufgetrennt. Zwei verschiedene Gelgrößen wurden verwendet: Hoefer 18x16cm und Biorad 10x8cm. Die größeren Hoefer-Gele wurden für den Western-Blot weiter verwendet.

Zusammensetzung für ein 1.5mm dickes Hoefer-Gel:

Trenngel:	7.5 ml	40% (v/v)	Acrylamid (29:1)
	7.5 ml	1.5M	Tris pH 8.8
	150 µl	20% (w/v)	SDS
	30 µl	10% (w/v)	APS
	18 µl		TEMED
	14.38 ml		H ₂ O

nach der Polymerisation für 20-30min. wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen

Sammelgel:	1.95 ml	40% (v/v)	Acrylamid:Bisacrylamid (29:1)
	2 ml	1M	Tris pH 6.8
	80 µl	20% (w/v)	SDS
	160 µl	10% (w/v)	APS
	16 µl		TEMED
	11.65 ml		H ₂ O

Für die kleineren 1.0mm Biorad-Gele wurde 1/10 der oben genannten Volumina verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 56V ÜN oder bei 180V ca. 2h durchgeführt. Die Proteine wurden durch 20minütige Inkubation in Coomassieblau-Färbelösung und ca. 30min. in Entfärbelösung (dreimal gewechselt) sichtbar gemacht.

2.2.17 Western Blotting

Die Übertragung von Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran (Protran von Schleicher und Schuell Nr.BA79), auch als Immunoblotting bekannt, wurde nach einem Protokoll von Towbin et al. (1979) und Burnette (1981) durchgeführt. Dafür wurde ein Naßblotsystem von Hoefer eingesetzt, bei dem in 2h bei 100V und 900-1000mA, die Proteine auf die Membran transferiert wurden.

Die Proteine auf der Nitrocellulose wurden anschließend 30sek. in Ponceaurot-Färbelösung gefärbt. Durch weitere 30sek. in H₂O wurde die nichtspezifische Färbung der Membran wieder gewaschen. Die Blockierung der Nitrocellulosemembran erfolgte ÜN bei 4°C in 5% (w/v) BSA oder 7% (w/v) Milchpulver jeweils in TBS/T oder in NET/G-Puffer. Die Inkubation mit dem Primärantikörper wurde 2h bei 4°C in dem entsprechenden Blocking-Reagenz mit einer Konzentration von 0.5-10µg/ml durchgeführt. Nach 3x 10min. waschen mit TBS/T wurde die Membran mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (200ng/ml) ½-1h bei RT inkubiert. Es folgte wieder 3x 10min. waschen. Die Detektion von Proteinen erfolgte über die an den Sekundärantikörper gekoppelte Horse-Reddish-Peroxidase und dem ECL-System von Amersham Pharmacia auf Röntgenfilm.

3. Ergebnisse

3.1 Expressions-Analysen

3.1.1 Klonierung eines 2kb großen cDNA-Fragmentes aus einer humanen foetalen Leber cDNA-Bibliothek

Der erste Schritt dieser Doktorarbeit bestand in der Expressions-Analyse des auf Chromosom 5q34 identifizierten Gens. Dazu sollte die aus Exonen und ESTs zusammengestellte cDNA von 1181bp durch eine tatsächlich exprimierte Sequenz bestätigt werden.

Durch Screenen einer humanen foetalen Leber cDNA-Bibliothek, mit einem aus dem vorangegangenen Exon-Trapping-Experiment isolierten Exon (s. 1.5), konnte ein ca. 2kb großer Klon isoliert werden.

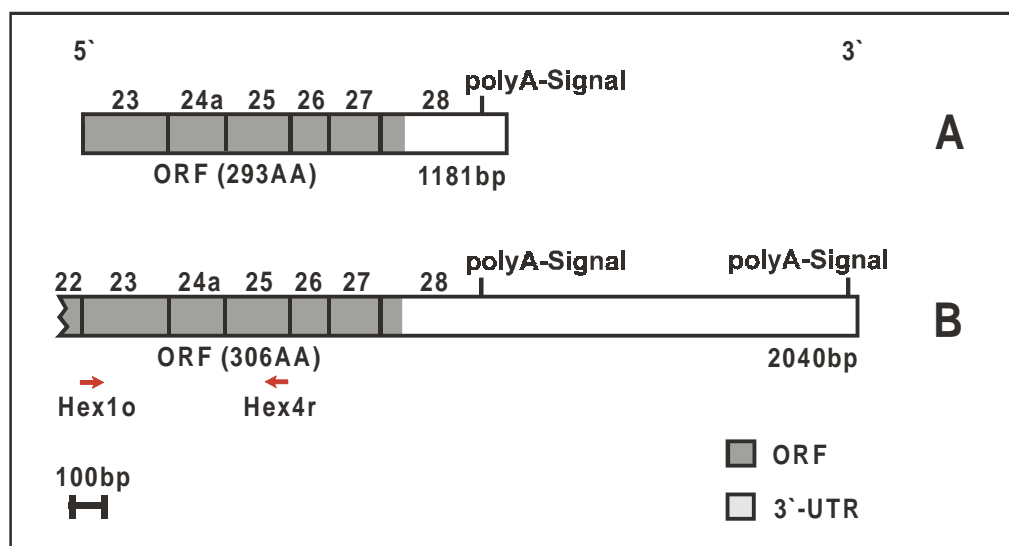


Abbildung 7: Sequenzierung eines 2kb-Klones aus einer humanen foetalen Leber cDNA-Bibliothek. A: Durch Exon-Trapping und EST-Datenbanksuche ermittelte cDNA.

B: 2kb Klon und PCR-Primer (Hex1o/Hex4r) zur Sondenherstellung.

Die Sequenzanalyse ergab eine Länge von 2040bp, in der die über Exon-Trapping bestimmten fünf Exone enthalten waren. Durch die spätere Klonierung eines vollständigen Transkriptes im Rahmen dieser Arbeit, konnte die Abfolge und Anzahl der Exone ermittelt werden. Diese Abfolge wird den folgenden Abbildungen bereits zugrunde gelegt.

Die bekannte cDNA-Sequenz von 1181bp konnte durch den 2kb cDNA-Klon um 38bp in 5'-, und um 821bp in 3'-Richtung erweitert werden. Am äußersten 3'-Ende wurde, neben dem Polyadenylierungssignal am Ende des 1181bp-Fragmentes, ein weiteres Polyadenylierungssignal mit anschließendem PolyA-Schwanz ermittelt. Dies deutete schon früh auf die Existenz

alternativ gespleißter 3'-Enden hin. Der ORF konnte insgesamt nur geringfügig von 293AA auf 306AA erweitert werden.

Durch die Primer Hex1o und Hex4r wurde die 513bp große Sonde 513 mittels PCR hergestellt und in den T-Vektor pMOS-Blue kloniert. Die durch einen EcoRI/SalI-Restriktionsverdau (Polylinkerschnittstellen) aufgereinigte cDNA-Sonde wurde für weitere cDNA-Screenings und zur Northern Blot Analyse eingesetzt.

3.1.2 Northern Blot Analysen

3.1.2.1 Northern Blot Analyse verschiedener humaner Gewebe mit der Sonde 513

Weitere cDNA-Screeningexperimente unter Nutzung von cDNA-Bibliotheken aus humaner foetaler Leber, humanen Fibroblasten und der Zelllinie HeLa, identifizierten keine weiteren Klone. Die Northern Blot Analyse von verschiedenen humanen Geweben sollte das oder die Gewebe ermitteln, in denen das unbekannte Gen am stärksten exprimiert wird. Das anschließende cDNA-Screening der betreffenden Gewebe sollte dann die effiziente Klonierung der vollständigen cDNA ermöglichen.

Zur Hybridisierung von drei verschieden humanen polyA⁺-Northern Blots verschiedener Gewebe, wurde die mittels PCR generierte Sonde 513 verwendet. Diese Sonde beinhaltet die Exone 23/24b/25 und liegt somit im Bereich des ORF. Zur Überprüfung der RNA-Mengen, die von den einzelnen Geweben aufgetragen wurden, erfolgte anschließend eine Kontrollhybridisierung mit einer Sonde für das Haushaltsgen β -Actin.

Das stärkste Signal ist in Testisgewebe zu sehen. Man erkennt zwei Transkripte von ca. 2.0kb und ca. 4.2kb. Das 4.2kb Transkript ist ebenfalls in der Bauchspeicheldrüse und in deutlich geringerem Maße in Schilddrüse, Gebärmutter und Lunge nachweisbar (Abb.8A/B). Auch in der Luftröhre und der Nebenniere sind sehr schwache Signale dieses Transkriptes zu erkennen. Bei der Bauchspeicheldrüse finden sich zwei weitere Transkripte von 7.5kb und 10.0kb.

Aufgrund der hohen Expression in Testis und Pankreas, sollten cDNA-Screeningexperimente von diesen Geweben die vollständige Klonierung dieses Gens ermöglichen. Parallel hierzu wurden 25 Leukämie- bzw. Neoplasiezelllinien durch PCR mit den Primern Hex1o/Hex2r (Exon 23-24a: 367bp) auf die Expression dieses Gens hin untersucht. Bei den Zelllinien HeLa, HT-29, K-562, MCF-7, THP-1 und Nalm-6 konnte das 367bp große Fragment amplifiziert

werden. Durch eine anschließende Northern Blot Analyse sollte festgestellt werden, ob das Expressionsmuster in den positiven Tumor-Zelllinien der Expression in humanem Testis- und Pankreasgewebe entspricht.

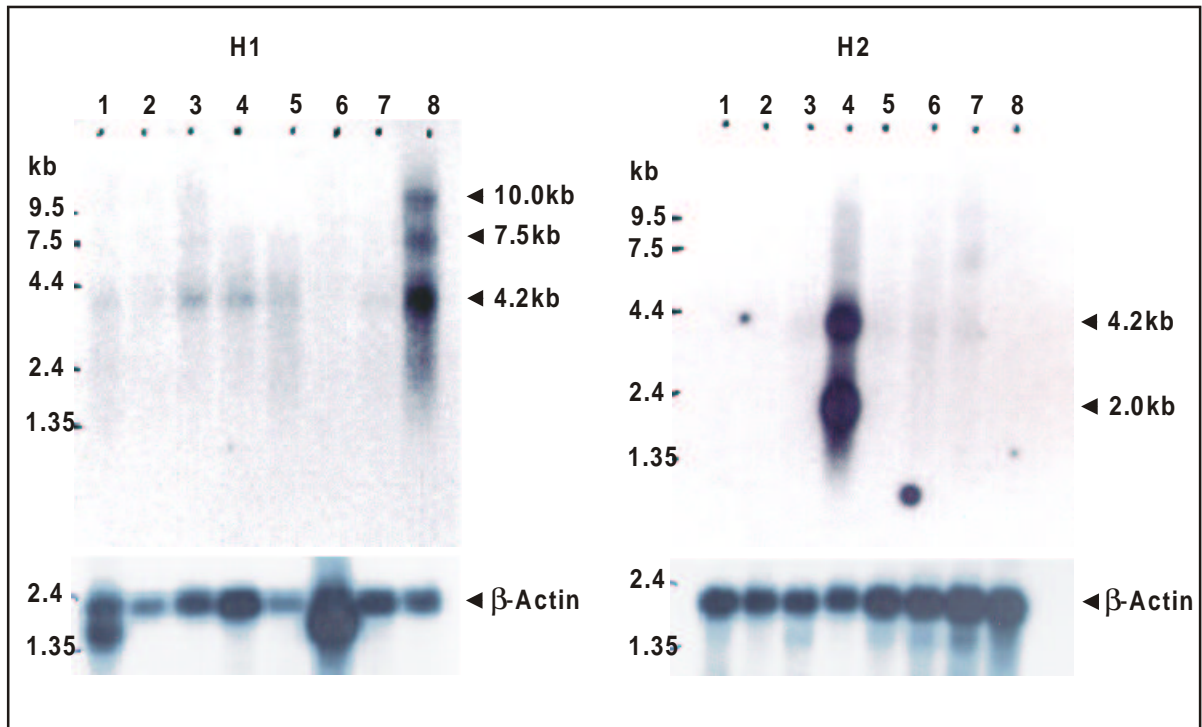


Abbildung 8A/B: Humane Northern Blots H1 und H2 mit der Sonde 513 hybridisiert.

H1:

- | | |
|----------------|-----------------------|
| 1. Herz | 5. Leber |
| 2. Hirn | 6. Skelettmuskel |
| 3. Gebärmutter | 7. Niere |
| 4. Lunge | 8. Bauchspeicheldrüse |

H2:

- | | |
|-------------|---------------------------------|
| 1. Milz | 5. Eierstock |
| 2. Thymus | 6. Dünndarm |
| 3. Prostata | 7. Dickdarm (Mukosa) |
| 4. Testis | 8. Peripheres Blut (Leukocyten) |

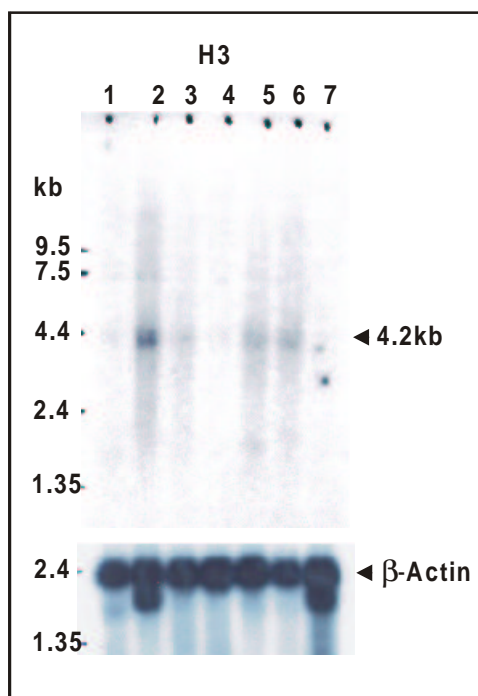


Abbildung 8C: Humaner Northern Blot H3 von Clontech mit der Sonde 513 hybridisiert.

1. Magen
2. Schilddrüse
3. Rückenmark
4. Lymphknoten
5. Luftröhre
6. Nebenniere
7. Knochenmark

3.1.2.2 Northern Blot Analyse von humanem Testis und der Leukämiezelllinie Nalm-6

Das cDNA-Screening einer humanen Testis Bibliothek ermöglichte die Erweiterung der cDNA in 5'-Richtung bis zum Exon 14a sowie die Generierung der neuen Sonde 230 (Abb.9). Diese Sonde diente der vergleichenden Northern Blot Analyse zwischen Testisgewebe und den oben genannten positiven Tumor-Zelllinien.

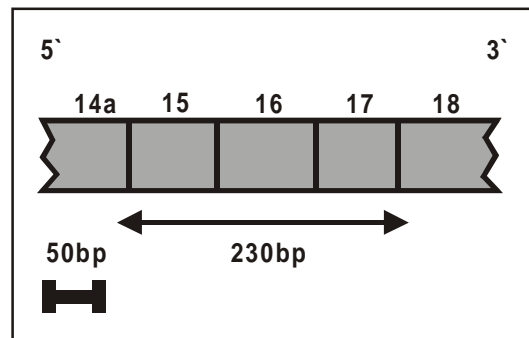


Abbildung 9: Sonde 230 mit den Exonen 15-17

Im humanen Testisgewebe und der prä-B-ALL Zelllinie Nalm-6 ist eine Expression von vier Transkripten zu erkennen (Abb.10). Die Expressionsstärke bei Testis ist dabei ca. 2-3mal höher als bei Nalm-6. Die Größen der Transkripte entsprechen den beiden Transkripten in Testis und den drei Transkripten in Pankreas (4.2kb, 7.5kb, 10.0kb), die von der Sonde 513 erkannt werden. Die in der Sonde 513 enthaltenen Exone werden wie aus den fehlenden Hybridisierungssignalen in Abbildung 8A/B abzuleiten ist, in den beiden Transkripten von 7.5kb und 10.0kb nicht exprimiert.

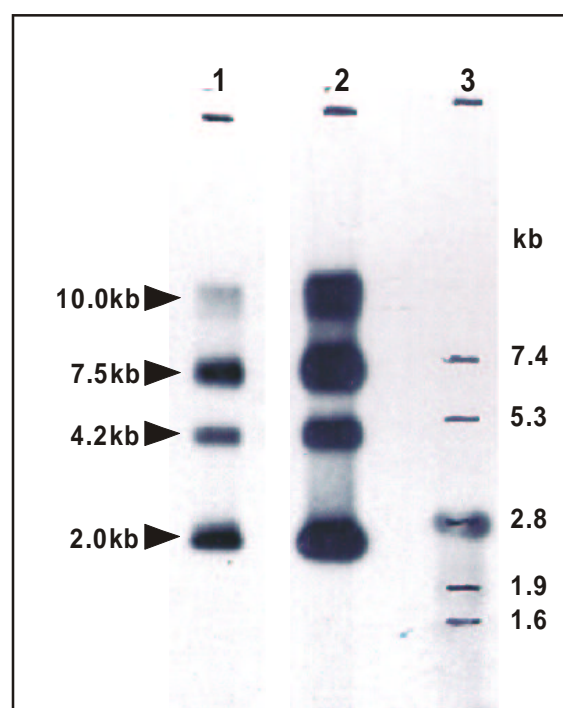


Abbildung 10: Testis und Nalm-6 Northern Blot mit Sonde 230 hybridisiert.

1. Nalm-6
2. Testis
3. RNA-Marker II

3.1.2.3 Northern Blot Analyse eines ALL-Patienten mit einer t(5;14)

Die bei vier ALL-Patienten identifizierte t(5;14)(q34;q11) legte die Vermutung nahe, daß das in der Bruchpunktnähe lokalisierte Gen durch Fehlregulation onkogene Potenz entfaltet. Durch die Northern Blot Analyse eines Patienten mit einer t(5;14) sollte überprüft werden, ob eine Aktivierung des auf Chromosom 5q34 gelegenen Gens für die Entstehung der Leukämie ursächlich ist. Eine abweichende, fehlende oder zusätzliche Bande sowie eine erhöhte oder erniedrigte Expression wäre ein wichtiger Hinweis in diese Richtung.

Die polyA⁺-RNA wurde aus dem Knochenmark eines t(5;14)-positiven Patienten isoliert (Patient 3), welches uns von Dr. Stephen W. Morris (St. Jude Childrens Research Hospital, Memphis, TN, USA) zur Verfügung gestellt wurde. Als Kontrolle wurde die polyA⁺-RNA von humanem Testisgewebe und den Leukämiezelllinien Nalm-6 sowie KMS12 eingesetzt. Die Menge der aufgetragenen RNA wurde anschließend durch eine Kontrollhybridisierung mit einer Sonde des Haushaltsgens GAPDH (Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase) kontrolliert.

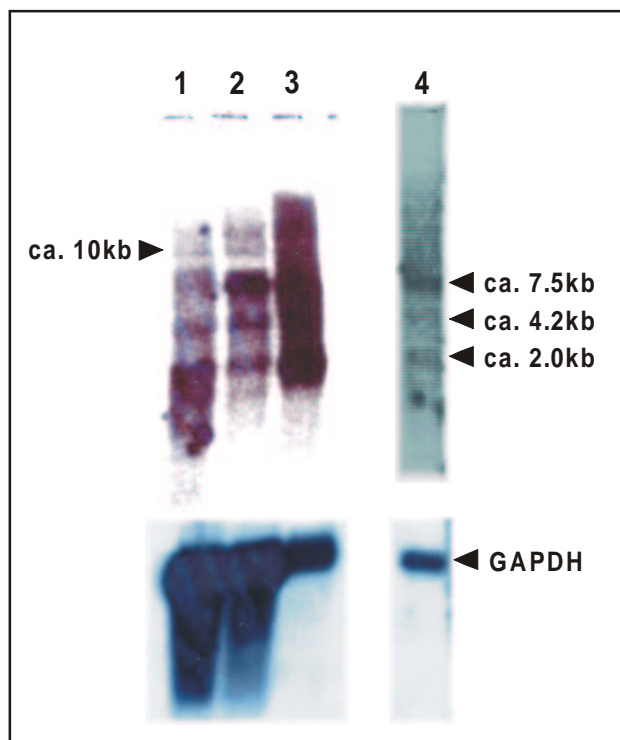


Abbildung 11:
Northern Blot Analyse eines ALL-
Patienten mit t(5;14) mittels der
Sonde 230 und GAPDH

- 1. KMS12 (ca. 1.2µg polyA⁺-RNA)
- 2. Nalm-6 (ca. 1.2µg polyA⁺-RNA)
- 3. Testis (ca. 10µg Total-RNA)
- 4. ALL-Patient (ca. 1.2µg polyA⁺-RNA)

Die Hybridisierung von Nalm-6 und Testisgewebe zeigte das bekannte Expressionsmuster mit vier Transkripten. KMS12 exprimiert dagegen die vier Transkripte in einem anderen Verhältnis. Dabei wird das 2.0kb Transkript am stärksten exprimiert. Nach dieser Exposition von einem Tag war beim Patienten nur sehr schwach die 7.5 und 2.0kb-Banden zu erkennen.

Durch eine Exposition von vierzehn Tagen (Abb.11, Spur 4) konnte man die drei stärksten Signale (2.0/4.2/7.5kb) auf der gleichen Höhe wie bei den Kontrollen erkennen. Die oberste 10kb-Bande ist aufgrund ihres geringen Expressionsniveaus nur sehr schwach zu sehen. Das Expressionsmuster scheint dem von Nalm-6 und humanem Testisgewebe zu entsprechen. Die geringere Signalstärke beim Patienten ist mit der deutlich geringeren RNA-Menge sowie deren schlechter Qualität zu erklären, wie die GAPDH-Hybridisierung zeigt. Eine eindeutige Aussage über eine Fehlregulation des Gens auf Chromosom 5q34 läßt sich anhand dieses Northern Blots jedoch nicht machen.

3.2. cDNA-Analysen

3.2.1 Screening humaner Testis cDNA-Bibliotheken

Nachdem durch die Northern Blot Analyse festgestellt worden war, daß das Gen auf Chromosom 5q34 in Testisgewebe exprimiert wird, wurde eine humane Testisbibliothek gescreent. Dazu wurde, wie für die Northern Blot Analyse, die Sonde 513 (Exone 23-25) eingesetzt. Die cDNA-Inserts der positiven Phagen-Klone wurden entweder mittels PCR amplifiziert oder durch Restriktions-Verdau isoliert.

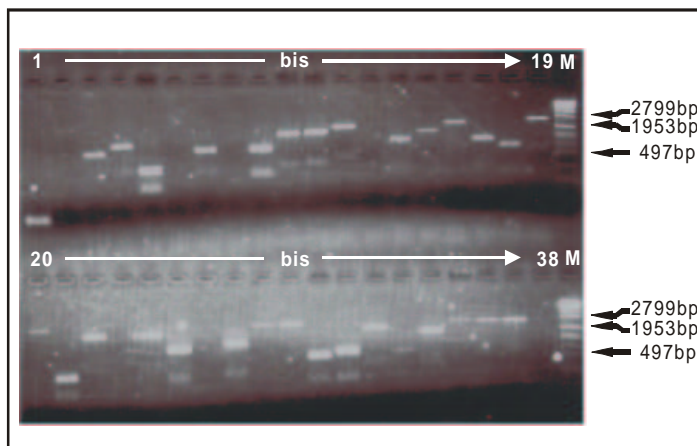


Abbildung 12A: PCR positiver Phagen-Klone

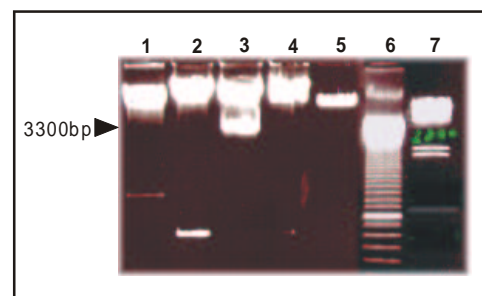


Abbildung 12B: EcoRI-Restriktionsverdau positiver Phagen-Klone

Die Abb.12A zeigt ein Agarosegel der mittels PCR amplifizierten Inserts, deren Größen von ca. 100bp bis ca. 2800bp reichen. Durch einen EcoRI-Verdau konnte ein Insert mit der Größe von ca. 3300bp isoliert werden (Abb.12B, Spalte 3). Nach Klonierung in die entsprechenden Plasmide erfolgte die Sequenzanalyse. Auf diese Weise konnten 34 Klone analysiert werden, die eine deutliche Erweiterung in 5'-Orientierung der cDNA erbrachte.

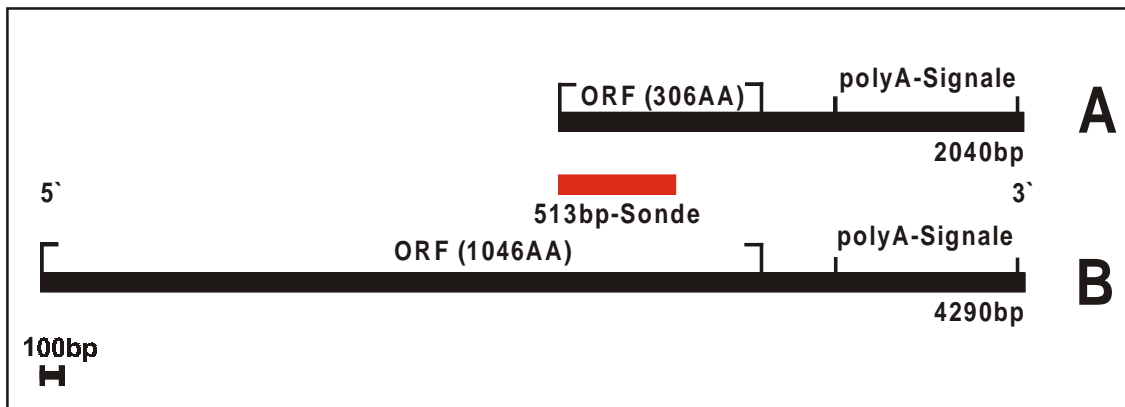
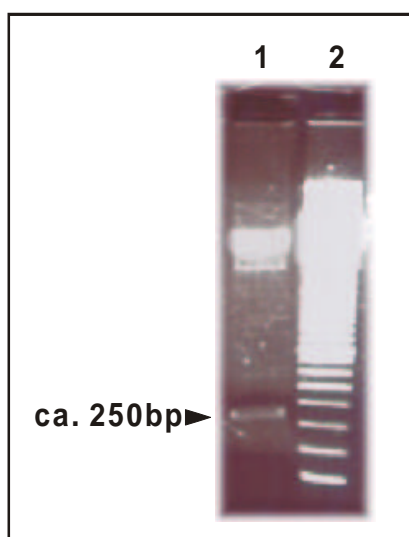


Abbildung 13: Screening einer humanen Testis cDNA-Bibliothek mit der Sonde 513; A: Bekannte cDNA; B: Erweiterte cDNA durch das Screenigexperiment.

Die bekannte cDNA mit einer Größe von 2040bp und einem ORF von 306AA (Abb.13A), konnte anhand der erhaltenen Klone auf 4290bp mit einem ORF von 1046AA erweitert werden (Abb.13B). Ein Startcodon wurde nicht identifiziert.

3.2.2 5'-RACE-PCR zur Klonierung des Startcodons

Da trotz wiederholtem Screening von cDNA-Bibliotheken ein Startcodon nicht gefunden werden konnte, wurde eine 5'-RACE-PCR von humaner Testis cDNA durchgeführt. Dafür wurde humane Testis Einzelstrang cDNA aus 1.5µg Total-RNA durch den genspezifischen 5'-Primer M3Drev synthetisiert.



An die gewonnene einzelsträngige cDNA wurden am 3'-Ende homopolymere Adaptersequenzen aus dCTP angehängt. Anschließend wurde eine PCR mit einem Adapterprimer und dem genspezifischen Primer Testis14rev durchgeführt.

Auf diese Weise konnte ein ca. 250bp großes cDNA-Fragment amplifiziert werden, das in den TOPO T-Vektor kloniert wurde (Abb.14).

Abbildung 14: EcoRI-Restriktionsverdau von TOPO mit 250bp RACE-Fragment

Die Sequenzierung des 5'-RACE-Fragmentes zeigte, daß es das Startcodon mit einer typischen Kozak-Konsensussequenz beinhaltet (Kozak, 1987). Die von Kozak am häufigsten

gefundene Sequenz um ein Startcodon in Eukaryonten lautet GCCACC **ATG** G. Das Startcodon lag nur 11bp in 5'-Richtung von der bisher bekannten cDNA-Sequenz entfernt (Abb.15).

Somit konnte eine komplette cDNA-Sequenz vom Startcodon bis zum polyA-Schwanz durch das RACE-Fragment erstellt werden.

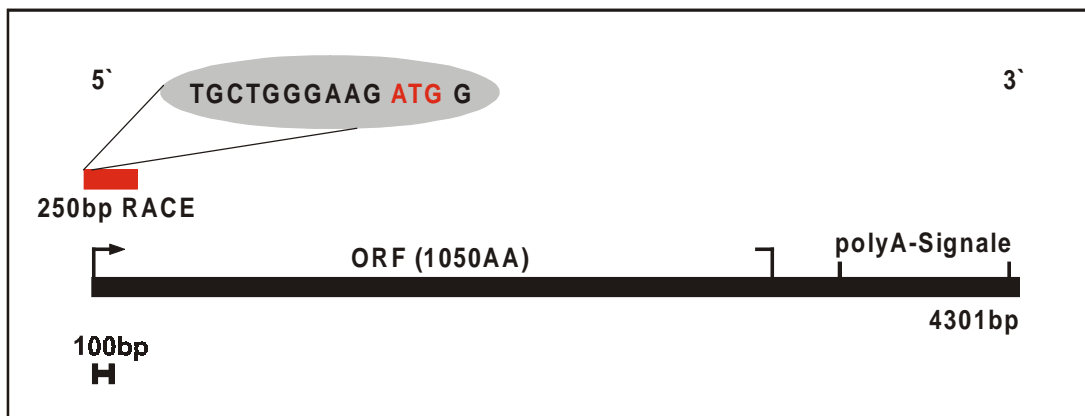


Abbildung 15: Vervollständigung der cDNA-Sequenz durch ein 250bp RACE-Fragment mit einem signifikanten Kozak-Startcodon.

3.2.3 Screening einer humanen Testis cDNA-Bibliothek von Clontech

Die von Clontech 1999 auf den Markt gebrachte humane Testis cDNA-Bibliothek Large-Insert, hat laut Hersteller eine Insertgröße von ca. 3.5kb im Durchschnitt. Da diese Bibliothek laut Hersteller Transkripte mit einer Größe bis zu 7.5kb besitzen soll, schien sie das geeignete Mittel zur Auffindung von Klonen mit einem vollständigen ORF.

Die Hybridisierung erfolgte mit der Sonde 427 (Exone 1-3), die 11bp in 3'-Orientierung vom Startcodon entfernt liegt. Die Wahrscheinlichkeit, damit ein vollständiges Transkript zu erhalten, sollte sehr hoch sein. Nach der Hybridisierung konnten 15 positive Klone isoliert werden, die in dem Bakterienstamm BM25.8 von Phagenvektoren in Plasmidvektoren überführt wurden. Vierzehn der Klone besaßen eine Größe von ca. 3.6kb, ein Klon hatte eine Größe von ca. 4.3kb. Die Sequenzierung wurde mittels Vektor- und genspezifischer Primer durchgeführt.

Zwei von den identifizierten Klonen weisen durch eine Insertion des neu identifizierten Exon 9 (120bp) einen ORF von 1088AA auf. Dieser repräsentiert das zur Zeit größte von diesem Gen kodierte Protein (Abb.16).

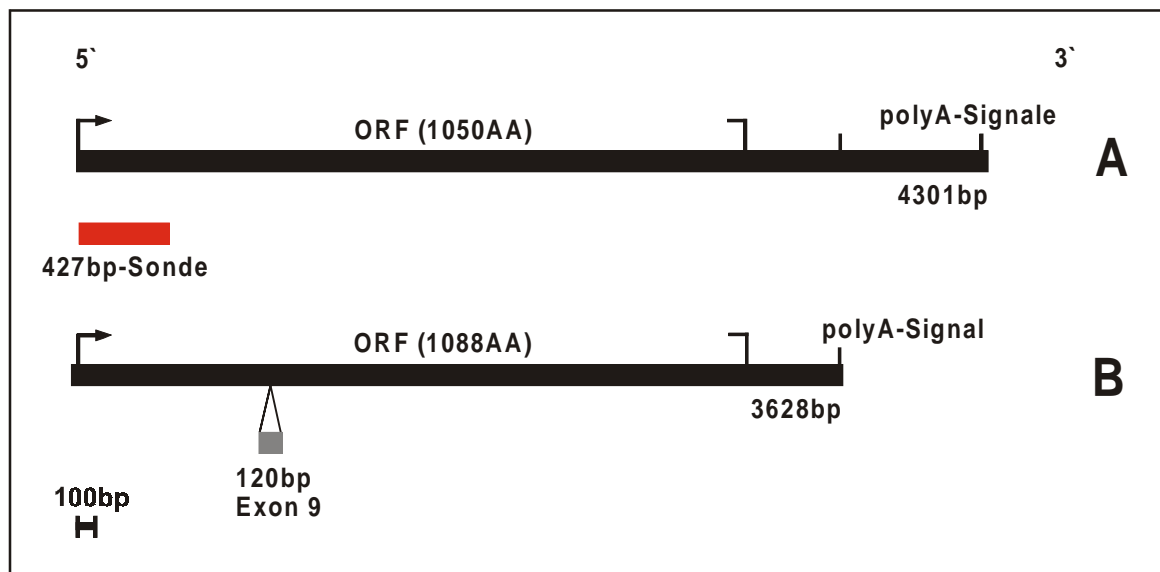


Abbildung 16: Screening einer humanen Testis cDNA-Bibliothek mit der Sonde 427 (Exone 1-3).

A: Bekannte Sequenz

B: Zwei Klone mit zusätzlicher 118bp-Sequenz und einem ORF von 1088AA

Durch Computer-gestützte BLAST-Homologievergleiche von genomischen Datenbanken mit sämtlichen cDNA-Sequenzen konnte die Exonstruktur dieses Gens ermittelt werden (Abb.17).

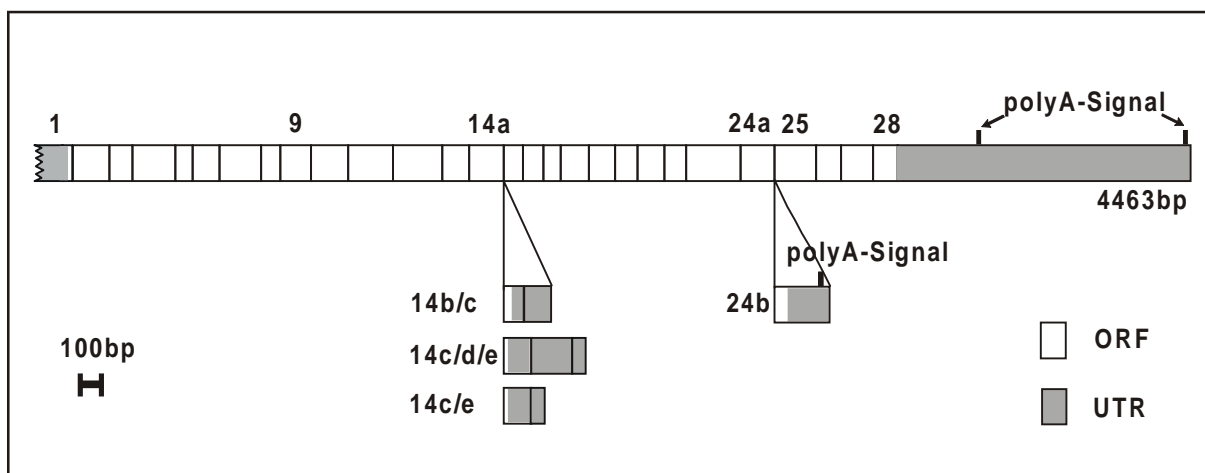


Abbildung 17: Exonstruktur von *ranBP17* (ORF= Open Reading Frame, UTR= Untranslated Region).

Die BLAST Homologiesuche ergab, daß das längste gefundene Transkript mit 4439bp und einem ORF von 1088AA aus 28 Exonen besteht. Zu beachten ist dabei, daß zwei Polyadenylierungssignale in Exon 28 für zwei unterschiedlich lange 3'-Enden verantwortlich sind. Bei einem sogenannten „read-through“ entsteht das längere Transkript von 4439bp, bei der Erkennung des ersten Polyadenylierungssignals entsteht ein Transkript von 3628bp. Beide haben den gleichen ORF von 1088AA. Die restlichen 13 Klone stellen Spleißvarianten dar, die sich bezüglich Exon 9, hinter Exon 14a, hinter Exon 24a und Exon 25 unterscheiden.

Exon 24b stellt ein drittes 3'-Ende mit einem Polyadenylierungssignal und einem PolyA-Schwanz. Der ORF wird durch die Exone 14b und 14c, in denen sich jeweils ein Stopcodon befindet, auf 536-579AA verkürzt.

Tabelle 3 stellt die Kombinationen der Spleißvarianten zusammen:

	Exon 9	Exon 14 b/c/d/e	Exon 24 (kurzes 3'- Ende)	Exon 25	bp/AA
Klon 1	+	-	-	-	4272/1033
Klon 2	-	14c	-	+	4437/536
Klon 3	+	14c/e	-	+	4616/576
Klon 4	+	14c	-	+	4557/576
Klon 5	+	14b/c	-	+	4637/580
Klon 6	+	14c	-	-	4390/576
Klon 7	-	14c/d/e	+	+	3645/536
Klon 8	+	-	-	+	4463/1088
Bekannte Sequenz	-	-	-	+	4301/1050

Tabelle 3: Spleißvarianten von 8 verschiedenen Klonen aus einer humanen Testis cDNA-Bibliothek von Clontech (Large Insert) und der bekannten *ranBP17*-Sequenz.

Die Analyse des von diesem Gen kodierten Proteins sowie eine BLAST-Genbanksuche ergab, daß es sich um ein parallel zu unseren Analysen entdecktes Gen handelte (Kutay et al., 2000), welches durch die Bindung an das G-Protein RAN den Export von Substraten aus dem Zellkern vermittelt.

3.2.4 cDNA-Sequenzen des *ranBP17*-Gens

Durch die Sequenzierung der *ranBP17*-cDNA-Klone konnte die Basen- und AA-Abfolge bestimmt werden.

		START		1	←→	2	
cDNA	1	GCCGCCTCCTGGGAAGATGGCGCTGCACTTCCAGAGTTTGGCTGAATTGGAAGTGTTATG					60
AA	1	MetAlaLeuHisPheGlnSerLeuAlaGluLeuGluValLeuCys					15
	61	TACTCATCTCTACATAGGGACTGATCTTACACAAAGAATAGAGGCTGAGAAAGCACTCTT					120
	16	ThrHisLeuTyrIleGlyThrAspLeuThrGlnArgIleGluAlaGluLysAlaLeuLeu					35
	121	GGAAGTTATTGACAGTCCAGAATGTCTCAGCAAGTGTCAACTTTTATTAGAACAAAGGAAC					180
	36	GluLeuIleAspSerProGluCysLeuSerLysCysGlnLeuLeuLeuGluGlnGlyThr					55

2	←	→	3		
181	AACATCCTATGCTCAGCTCCTTGCAGCAACATGTCTTTCAAACCTTGTCTCAGCCGAGTCAG	240			
56	ThrSerTyrAlaGlnLeuLeuAlaAlaThrCysLeuSerLysLeuValSerArgValSer	75			
			3	←	→
241	TCCTTTACCTGTTGAGCAGAGGATGGACATCAGAACTACATTCTGAATTACGTGGCATC	300			
76	ProLeuProValGluGlnArgMetAspIleArgAsnTyrIleLeuAsnTyrValAlaSer	95			
				4	←
301	ACAGCCCAAGCTGGCTCCCTTTGTCTATCCAAGCTCTTATTCAAGTCATTGCTAAAATCAC	360			
96	GlnProLysLeuAlaProPheValIleGlnAlaLeuIleGlnValIleAlaLysIleThr	115			
					5
361	TAAGTTGGGGTGGTTTGAGGTTGAGAAAGACCAATTTGTCTTCAGAGAAATTATTGCTGA	420			
116	LysLeuGlyTrpPheGluValGlnLysAspGlnPheValPheArgGluIleIleAlaAsp	135			
			4	←	→
421	TGTGAAGAAGTTTCTCCAGGGTACTGTGGAACACTGCATAATAGGAGTAATAATCCTTTC	480			
136	ValLysLysPheLeuGlnGlyThrValGluHisCysIleIleGlyValIleIleLeuSer	155			
				5	←
481	TGAATTGACTCAGGAAATGAACCTGTTGATTATTCTAGACCTTCAGCAAAACACAGGAA	540			
156	GluLeuThrGlnGluMetAsnLeuValAspTyrSerArgProSerAlaLysHisArgLys	175			
					6
541	AATAGCTACCTCATTTCGTGATACTTCTCTCAAAGACGTTTTAGTGCTAGCATGCTCTCT	600			
176	IleAlaThrSerPheArgAspThrSerLeuLysAspValLeuValLeuAlaCysSerLeu	195			
			6	←	→
601	TTTAAAGAGGTGTTTGCCAAACCTTTAAATCTTCAGGATCAATGTCAGCAAAATCTGGT	660			
196	LeuLysGluValPheAlaLysProLeuAsnLeuGlnAspGlnCysGlnGlnAsnLeuVal	215			
					7
661	AATGCAGGTCTTGAAACTGGTCCTTAACTGCCTTAACTTTGACTTCATTGGCAGTTCAGC	720			
216	MetGlnValLeuLysLeuValLeuAsnCysLeuAsnPheAspPheIleGlySerSerAla	235			
					8
721	AGATGAATCTGCAGATGATCTTTGCACGGTGCAGATTCCAACAACCTGGGAGAACAAATTTT	780			
236	AspGluSerAlaAspAspLeuCysThrValGlnIleProThrThrTrpArgThrIlePhe	255			
					9
781	CCTGGAACCAGAAACATTGGATCTTTTCTTCAATTTGTATCATTCACCTCCACCACTACT	840			
256	LeuGluProGluThrLeuAspLeuPhePheAsnLeuTyrHisSerLeuProProLeuLeu	275			
			8	←	→
841	ATCTCAGTTAGCACTTTTCATGTTTAGTTTCAGTTTGCTTCGACAAGAAGGTCTTATTTAA	900			
276	SerGlnLeuAlaLeuSerCysLeuValGlnPheAlaSerThrArgArgSerLeuPheAsn	295			
					10
901	CAGTCCTGAACGTGCCAAGTACCTTGGTAATTTAATTAAGGGAGTAAAAGGATACTTGA	960			
296	SerProGluArgAlaLysTyrLeuGlyAsnLeuIleLysGlyValLysArgIleLeuGlu	315			
			9	←	→
961	AAACCCTCAGGTTTGTCTGATCCAGGTAATTATCATGAATTTTGTGATTTTGGCTCG	1020			
316	AsnProGlnGlyLeuSerAspProGlyAsnTyrHisGluPheCysArgPheLeuAlaArg	335			
					11
1021	TTTAAAGACAAATTATCAGCTGGGAGAATTAGTTATGGTGAAGGAATATCCTGAAGTTAT	1080			
336	LeuLysThrAsnTyrGlnLeuGlyGluLeuValMetValLysGluTyrProGluValIle	355			
			10	←	→
1081	TAGATTGATTGCTAATTTTACCATTACTAGCCTACAGCACTGGGAATTTGCTCCTAACAG	1140			
356	ArgLeuIleAlaAsnPheThrIleThrSerLeuGlnHisTrpGluPheAlaProAsnSer	375			
					12
1141	TGTTTCATTATTTATTAACCTCTGTGGCAAAGGATGGTAGCATCTGTTCCCTTTTGTGAAATC	1200			
376	ValHisTyrLeuLeuThrLeuTrpGlnArgMetValAlaSerValProPheValLysSer	395			
					13
1201	AACTGAACCCACCTATTAGACACTTATGCACCAGAAATCACGAAGGCCTTTATCACTTC	1260			
396	ThrGluProHisLeuLeuAspThrTyrAlaProGluIleThrLysAlaPheIleThrSer	415			
			11	←	→
1261	TCGGTTGGACTCTGTTGCCATAGTTGTGAGATCACTTAGATGATCCACTGGATGATAC	1320			
416	ArgLeuAspSerValAlaIleValValArgAspHisLeuAspAspProLeuAspAspThr	435			
					14
1321	TGCCACTGTGTTTCAGCAGTTGGAGCAGTTGTGCACGGTCAGCAGATGTGAATATGAAAA	1380			
436	AlaThrValPheGlnGlnLeuGluGlnLeuCysThrValSerArgCysGluTyrGluLys	455			

1381 GACATGTGCTCTTCTTGTGCAGTTATTCGACCAAAATGCACAGAATTACCAAAAACCTTCT 1440
 456 ThrCysAlaLeuLeuValGlnLeuPheAspGlnAsnAlaGlnAsnTyrGlnLysLeuLeu 475

12 13

1441 GCATCCATATTCTGGTGTAACTGTGGACATCACCATTTCAGGAAGGACGTCTTGCATGGCT 1500
 476 HisProTyrSerGlyValThrValAspIleThrIleGlnGluGlyArgLeuAlaTrpLeu 495

13 14a

1501 GGTATACTTAGTTGGGACAGTTGTAGGAGGAAGATTAACATATACCAGTACAGATGAGCA 1560
 496 ValTyrLeuValGlyThrValValGlyGlyArgLeuThrTyrThrSerThrAspGluHis 515

1561 TGATGCTATGGATGGAGAATTATCCTGTCCGAGTTTTTTCAGCTTATATCTTTAATGGATAC 1620
 516 AspAlaMetAspGlyGluLeuSerCysArgValPheGlnLeuIleSerLeuMetAspThr 535

14a 15

1681 GTTTCGTAAAAACATATGTTGGTGATCAACTTCAAAGAACCCTCAAAGGTATATGCTCGTAT 1740
 556 PheArgLysThrTyrValGlyAspGlnLeuGlnArgThrSerLysValTyrAlaArgMet 575

15 16

1741 GTCAGAAGTCTTAGGAATAACAGATGACAACCACGTTCTAGAGACGTTTCATGACAAAAAT 1800
 576 SerGluValLeuGlyIleThrAspAspAsnHisValLeuGluThrPheMetThrLysIle 595

1801 TGTTACAAACCTTAAATACTGGGGAAGATATGAGCCTGTAATTTCAAGGACTCTTCAGTT 1860
 596 ValThrAsnLeuLysTyrTrpGlyArgTyrGluProValIleSerArgThrLeuGlnPhe 615

16 17

1861 CCTAAATGACCTTTCTGTTGGTTATATCCTTTTAAAAAACTTGTGAAGATAGATGCTGT 1920
 616 LeuAsnAspLeuSerValGlyTyrIleLeuLeuLysLysLeuValLysIleAspAlaVal 635

17 18

1921 GAAATTCATGCTAAAAAACACACAGAGTGAACACTTCCCTTTTCTTGGCATCAGTGACAA 1980
 636 LysPheMetLeuLysAsnHisThrSerGluHisPheProPheLeuGlyIleSerAspAsn 655

1981 TCATAGTCTCAGCGACTTCAGGTGTGCAACAACCTTCTACACAGCGCTCACTCGCCTTCT 2040
 656 HisSerLeuSerAspPheArgCysArgThrThrPheTyrThrAlaLeuThrArgLeuLeu 675

18 19

2041 GATGGTAGATCTGGGTGAAGATGAGGATGAATTTGAGAATTTTCATGCTGCCTCTTACAGT 2100
 676 MetValAspLeuGlyGluAspGluAspGluPheGluAsnPheMetLeuProLeuThrVal 695

19 20

2101 TGCTTTTGAAACAGTATTACAAATATTCAACAACAACCTTTAAACAAGAAGATGTAAAGCG 2160
 696 AlaPheGluThrValLeuGlnIlePheAsnAsnAsnPheLysGlnGluAspValLysArg 715

2161 TATGTTGATCGGGCTGGCAAGAGATCTTCGAGGGATTGCCTTTGCACTGAACACAAAGAC 2220
 716 MetLeuIleGlyLeuAlaArgAspLeuArgGlyIleAlaPheAlaLeuAsnThrLysThr 735

20 21

2221 CAGCTACACCATGCTGTTTGACTGGATGTACCCAACGTACCTTCCCCTTCTTCAGAATGC 2280
 736 SerTyrThrMetLeuPheAspTrpMetTyrProThrTyrLeuProLeuLeuGlnAsnAla 755

2281 TGTTGAACGGTGGTATGGAGAGCCAACATGTACAACCTCCCATCTTGAAACTTATGGCAGA 2340
 756 ValGluArgTrpTyrGlyGluProThrCysThrThrProIleLeuLysLeuMetAlaGlu 775

21 22

2341 ACTTATGCAAAACAGATCCCAGCGTTTGAATTTTGATGTATCATCTCCTAATGGAATTCT 2400
 776 LeuMetGlnAsnArgSerGlnArgLeuAsnPheAspValSerSerProAsnGlyIleLeu 795

22 23

2401 TCTCTTCAGAGAAGCTAGTAAAAATGGTTTGCACCTTATGGTAATCAGATCCTGTCCCTTGG 2460
 796 LeuPheArgGluAlaSerLysMetValCysThrTyrGlyAsnGlnIleLeuSerLeuGly 815

2461 GAGCCTCTCAAAAGATCAGATTTATCCAATGAAACTCAAGGGCATCTCCATCTGCTATTC 2520
 816 SerLeuSerLysAspGlnIleTyrProMetLysLeuLysGlyIleSerIleCysTyrSer 835

2521 AGCTCTCAAGTCTGCCTTGTGTGGAAATTATGTCAGCTTTGGCGTCTTCAAGTTGTATGG 2580
 836 AlaLeuLysSerAlaLeuCysGlyAsnTyrValSerPheGlyValPheLysLeuTyrGly 855

```

2581 GGACAACCATTTTGACAATGTACTCCAGGCTTTTGTCAAAATGCTGCTGTCAGTGTCCCA 2640
856 AspAsnHisPheAspAsnValLeuGlnAlaPheValLysMetLeuLeuSerValSerHis 875
      23  ←→ 24a
2641 CAGTGACTTGCTACAATACCGGAACTGAGCCAGTCTTATTATCCACTCCTGGAATGTCT 2700
876 SerAspLeuLeuGlnTyrArgLysLeuSerGlnSerTyrTyrProLeuLeuGluCysLeu 895

2701 CACTCAGGACCATATGAGCTTCATCATCAACTTAGAGCCTCCTGTACTCATGTATGTTCT 2760
896 ThrGlnAspHisMetSerPheIleIleAsnLeuGluProProValLeuMetTyrValLeu 915
      24a ←→ 25
2761 CACATCTATCTCAGAGGGACTCACTACTCTTGATACAGTTGTCTCCTCCAGCTGCTGTAC 2820
916 ThrSerIleSerGluGlyLeuThrThrLeuAspThrValValSerSerSerCysCysThr 935

2821 CAGTTTAGACTACATCGTCACCTACCTCTTCAAGCACATAGCAAAAGAGGGCAAGAAGCC 2880
936 SerLeuAspTyrIleValThrTyrLeuPheLysHisIleAlaLysGluGlyLysLysPro 955

2881 ACTTCGATGCAGAGAGGCTACCCAGGCTGGTCAGAGACTATTACATTTTATGCAGCAAAA 2940
956 LeuArgCysArgGluAlaThrGlnAlaGlyGlnArgLeuLeuHisPheMetGlnGlnAsn 975
      25  ←→ 26
2941 CCCAGATGTCCTGCAGCAGATGATGTCTGTCTCATGAACACCATTGTCTTTGAAGACTG 3000
976 ProAspValLeuGlnGlnMetMetSerValLeuMetAsnThrIleValPheGluAspCys 995
      26  ←→ 27
3001 TCGGAACCAGTGGTCAGTATCCAGGCCTCTCCTGGGGCTCATCCTGCTCAATGAGAAGTA 3060
996 ArgAsnGlnTrpSerValSerArgProLeuLeuGlyLeuIleLeuLeuAsnGluLysTyr 1015

3061 TTTCAGTGAACTGAGAGCAAGTTTGATAAACAGCCAGCCCCCTCCCCAAGCAGGAGGTCCT 3120
1016 PheSerGluLeuArgAlaSerLeuIleAsnSerGlnProLeuProLysGlnGluValLeu 1035

3121 TGCCCAGTGCTTCAGAAACCTAATGGAAGGAGTGGAGCAGAACCTGTCCGTCAAGAACAG 3180
1036 AlaGlnCysPheArgAsnLeuMetGluGlyValGluGlnAsnLeuSerValLysAsnArg 1055
      27  ←→ 28
3181 AGACAGGTTCAACCAAAATCTGTCTGTATTTCAGAAGAGATGTGGCAGAGGCGTTGCGCAG 3240
1056 AspArgPheThrGlnAsnLeuSerValPheArgArgAspValAlaGluAlaLeuArgSer 1075
      STOP
3241 TGATGGCAACACTGAACCATGCAGTCTCGACATGATGAGCTGACCCGACTTTTCTGACCA 3300
1076 AspGlyAsnThrGluProCysSerLeuAspMetMetSer 1088

3301 TGTGCGGAGCAGCCTTTATCAAGAGACTCCTGAAGGTCTGGGTCTCAGGACAGTGATGTT 3360

3361 GGCTAGCCCAGGGGAATGTATTTTTTCAAAACATACAAGCAACAGCAAAAGCCCTAACTTC 3420

3421 TTATACGTCTAGCCTAATTATAAGAATTTCTAACAGTACCAGTGTAATTCAGTCTTTTC 3480

3481 TCTGAAAAGCAAAGGATGTGTTTTTCAGTCTTTCTATCAAATATTATCTTTGTTCTCCTAA 3540
      1. Polyadenylierungssignal
3541 TGCTCTGAAAGGATGTAGAAACAATATTTAACCAAAGAACGTAATAAACAGGTTTGCAC 3600

3601 CTAAGTGTGTACTAGTTTATGGTTCTGCAGTCAAGGTTGTCAATTTGTTGGAGATGCAGC 3660

3661 CTTACCATGGATCCTGGATTGAGACGAATGCCATTGGAACCTGTTAAATGAGTAGTTTG 3720

3721 TTATGTGTCTGGAAGAAGCAGCGTTAGGGACTTTGGGCTGTGAGCATTTAGAACGAGCCT 3780

3781 GGAAGCACTACAGAGCATCCCACAGGACCACACGCAGGCCTCCCTGCCTCAGCTGCATCT 3840

3841 GATAAAGTTGAGAGACAGTAACACAATTAATGACTTAGAAACAATGTTTGCTTTTCACT 3900

3901 GGCATAAATCTGAAGTGGTTCAGTCTAGAAGAATTAAGCTGTGCAATTACTGCCTGCAGA 3960

3961 GATATTTCTTCAGGAGGAGTCATGTAGCCCCAGTCAGAAAGTTCTGGGTGGTGCCAGCACC 4020

4021 CAGTCCTCTGCCTCCATTTAATTTTTTAAGAGAAGGTGAAGGTAACCTATTAGAATATAATA 4080

```

```

4081 TTTGAAGCAGCTCTGCCTTCTTAGGGCTACCCAAAACAGTTCTAGGTGCTAAAATTTCAGA 4140
4141 TTTTCAGAGGATGAGAAATAGCTGGTTTCCAACCTCTCCACAAAAACTCTTATTACTGTTG 4200
4201 GGACTTGGGATTCTGACTTACCCCAAACCCAGAACATGAAGAAGACCTTTACAGTTTGTG 4260
4261 CTCTACTGTTACTAGGCTATTAATTTGAGATCGTCCACTGTCAAGTGTTTTACTATCTCA 4320
4321 CTGCTGTTTTTATGATTTCAGGCTTATAACAAATATTGTATCCTTTATTTCTGATAAGACA 4380
                2. Polyadenylierungssignal
4381 TGAAAGGTTGGCCTTACTGTTGAACAATAAGTAAATCCACAGGCTCCTGTTGTAATCTCA 4440
4441 AAAAAAAAAAAAAACCGGAATTC 4463

```

Abbildung 18: cDNA- und AA-Sequenz des *ranBP17*-Gens mit dem längsten ORF von 1088AA; Pfeilmarkierungen = Exongrenzen.

Die unter Abbildung 18 dargestellte cDNA-Sequenz hat einen ORF von 1088AA. Sie repräsentiert das bisher größte von RanBP17 beschriebene Protein. Die Spleißvarianten der Exone 14b-e und 24b verkürzen das Protein erheblich (Abb.19).

1.

```

                14a  ←→  14b
cDNA1702 TGATCAACTTCAAAGAACCTCAAAGGAAGTTGCTGGAGACTGTATACTACTCAATTAAAA 1761
AA   563  AspGlnLeuGlnArgThrSerLysGluValAlaGlyAspCysIleLeuLeuAsnEnd 580

1762 AAGTAAACCAAGAAAAGAGGAAGAAGGGAGAGATGGGATCTGAGAATCAGAGGATCAAAC 1821
1822 ACAGGAGAGAGGCTAAGGGAAGCTCTCGGATAACAGCTGTGCCTCAGGCCTTGAGAGCAA 1881
                14b  ←→  14c
1882 CCAGTTCAAACTGGAGCAGATGGAAGCAAGACAGACATCTTCCTGTGAAGGGCTTGTGGCA 1941
1942 AACCTATCCAACCTCGGGTTTCTTCTTCCTTGAGAACGATCTGATTCATCATCATCTGAAC 2001
                14c  ←→  15
2002 CAGGGATCACAGTCTAAGGTCCAGGTATATGCTCGTATGTCAGAAGTCTTAGGAATAACA 2061

```

2.

```

                14a  ←→  14c
cDNA1678 TCAGTTTCGTAAAACATATGTTGGTGATCAACTTCAAAGAACCTCAAAGAAGACAGACAT 1737
AA   555  GlnPheArgLysThrTyrValGlyAspGlnLeuGlnArgThrSerLysLysThrAspIle 574

1738 CTTCTGTGAAGGGCTTGTGGCAAACCTATCCAACCTCGGGTTTCTTCTTCCTTGAGAACG 1797
575  PheLeuEnd 576

1798 ATCTGATTCATCATCATCTGAACCAGGGATCACAGTCTAAGGTCCAGGTATATGCTCGTA 1857
                14c  ←→  15

```

3.

```

                14a  ←→  14c
cDNA1681 GTTTCGTAAAACATATGTTGGTGATCAACTTCAAAGAACCTCAAAGAAGACAGACATCTT 1740
AA   556  PheArgLysThrTyrValGlyAspGlnLeuGlnArgThrSerLysLysThrAspIlePhe 575

1741 CCTGTGAAGGGCTTGTGGCAAACCTATCCAACCTCGGGTTTCTTCTTCCTTGAGAACGATC 1800
576  LeuEnd

1801 TGATTCATCATCATCTGAACCAGGGATCACAGTCTAAGGTCCAGGCCTTGCGTGGCTCCC 1860
                14c  ←→  14d
1861 CAGCGCCAGTATCCCTTGCTTTACTGAATAGATGTGTTTAAGCAAGTTGGCTTTGAAACA 1920

```

1921	AGTTTCTCCTATGTGAATTGCATTTTCTGGTTGACACCCATTACAAAATTGGAAATGCAT	1980
	14d ←→ 14e	
1981	TTCCATGGAAAATCTCCTATGCCCAGTTGTACGCCTGAGGAGTGATGTACCCAGAGTTCC	2040
	14e ←→ 15	
2041	AGAGAAGGCTTGGAAAATAGTTAAGGTATATGCTCGTATGTCAGAAAGTCTTAGGAATAAC	2100
4.		
	14a ←→ 14c	
cDNA 1678	TCAGTTTCGTAAAAACATATGTTGGTGATCAACTTCAAAGAACCTCAAAGAAGACAGACAT	1737
AA 555	GlnPheArgLysThrTyrValGlyAspGlnLeuGlnArgThrSerLysLysThrAspIle	574
1738	CTTCCTGTGAAGGGCTTGTGGCAAACCTATCCAACCTCGGGTTTCTTCTTCCTTGAGAACG	1797
575	PheLeuEnd	576
	14c ←→ 14e	
1798	ATCTGATTTCATCATCATCTGAACCAGGGATCACAGTCTAAGGTCCAGTTGTACGCCTGA	1857
	14e ←→ 15	
1858	GGAGTGATGTACCCAGAGTTCCAGAGAAGGCTTGGAAAATAGTTAAGGTATATGCTCGTA	1917
5.		
	24a ←→ 25	
cDNA 2761	CACATCTATCTCAGAGGGACTCACTACTCTTGGTAAGGATCATAGAGGACATTGTTTCCA	2820
AA 916	ThrSerIleSerGluGlyLeuThrThrLeuGlyLysAspHisArgGlyHisCysPheHis	935
2821	TAGGAAAAAAGTATGATTATGGGCTTTTAATGTATGTGATTATTGAGACTATCATCCTACAA	2880
936	ArgLysAsnLeuIleMetGlyPheEnd	943
2881	AGGGGGAAAAGATATTGTGAACCCAACTGAAAGATTATAATTATTACTTGCAAGTGGGA	2940
2941	AAAATGTATTTCTTCATATTTTGATACATAGTCAGTTATGTTTAAATCAGCTTTACTGAG	3000
	3. Polyadenylierungssignal	
3001	GTATAATTTACATACAATAAAATTCAGTGACTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	3060

Abbildung 19: Sequenzen der Spleißvarianten zwischen Exon 14a, Exon 15 und nach Exon 24a.

Die hinter Exon 14a insertierenden Exone 14b und 14c beinhalten jeweils ein Stopcodon, so daß die resultierenden Proteine 573 und 576AA groß sind. Das hinter Exon 24a insertierende Exon 24b, das ein Stopcodon und ein Polyadenylierungssignal besitzt, führt zu einem Protein mit einer Länge von 943AA .

3.3 Genomische Analysen des humanen *ranBP17*

3.3.1 Exon-Intron-Struktur

Die Untersuchung der 28 Exone und der Spleißvarianten von *ranBP17* ergab, daß die Übergänge von Intron-Exon-Intron weitgehend mit den Spleißregeln übereinstimmen (Tab.4). Diese lauten, daß am 5`-Ende eines Introns die Basenfolge ...GT... und am 3`-Ende die Basenfolge ...AG... zu finden sind (Brethnach and Chambon, 1981; Sharp, 1987; Kramer, 1996).

Ergebnisse

	splice-donor-site		splice-acceptor-site	
exon1 ?	...TCCAGgtcagtgctc...	intron 1 16815bp	...ttcttgaagAGTTT...	exon 2
exon 2 147bp	...GAACAgtaagtattt...	intron 2 3637bp	...ttctttacagGCATC...	exon 3
exon 3 91bp	...CATCAGtaagtgctc...	intron 3 10647bp	...ttcttttagGAAAC...	exon 4
exon 4 167bp	...TCCAGgtaagaagtc...	intron 4 3497bp	...ttctcaaagGGTAC...	exon 5
exon 5 66bp	...ACCTGgtaagcgagc...	intron 5 13543bp	...tatcttttagGTTGA...	exon 6
exon 6 105bp	...AAGAGgtaagttatt...	intron 6 1719bp	...ctttttcagGTGTT...	exon 7
exon 7 166bp	...AACAAgtaagaaaa...	intron 7 2528bp	...tttttccagTTTTC...	exon 8
exon 8 74bp	...AGTTAgtaagtaaaa...	intron 8 2252bp	...gtatttttagGCACT...	exon 9
exon 9 120bp	...CTCAGgtattatgaag...	intron 9 2129bp	...cataatttagGGTTT...	exon 10
exon 10 147bp	...TACAGgtaggtaaaa...	intron 10 580bp	...ttcttttagCACTG...	exon 11
exon 11 173bp	...GTGAGgtattcaaaa...	intron 11 4742bp	...gtgtttgcagAGATC...	exon 12
exon 12 194bp	...GGAAGgtcagtaaac...	intron 12 4742bp	...tctatattagGACGT...	exon 13
exon 13 106bp	...TGTCGgtaagtaaga...	intron 13 ?	...cttcatgaagAGTTT...	exon 14a
exon 14a 136bp	...CAAAGgtacgtttct...	intron 14 14683bp	...cttttaccagGAAGT...	exon 14b
exon 14b 181bp	...GGAAGgtcatagtgt...	intron 15 ??AAGAC...	exon 14c
exon 14c 118bp	...TCCAG?.....	intron 16 ?	...tttcccttagGCCTT...	exon 14d
exon 14d 160bp	...GCCCAGtaagtttag...	intron 17 2913bp	...tgcttttttagGTTGT...	exon 14e
exon 14e 59bp	...TTAAGgtgagttggg...	intron 18 ?	...tttaatgcagGTATT...	exon 15
exon 15 74bp	...AAAATgtgagttctt...	intron 19 1003bp	...ttcatattagTGTTA...	exon 16
exon 16 81bp	...GTTGGatatcctttt...	intron 20 ?	...cttctattacTTATA...	exon 17
exon 17 64bp	...ACACGgtaagtctta...	intron 21 91bp	...cttcatttagAGTGA...	exon 18
exon 18 109bp	...TCTGGgtaaggttaa...	intron 22 16236bp	...tctctgatagGTGAA...	exon 19
exon 19 104bp	...TAAAGgtgggtttgt...	intron 23 5759bp	...ccactgacagCGTAT...	exon 20
exon 20 89bp	...TGGATgtatccttat...	intron 24 8015bp	...ctataaaaagGTACC...	exon 21
exon 21 108bp	...AACAGgtaagcagtg...	intron 25 8017bp	...tatttcttagATCCC...	exon 22
exon 22 83bp	...TTATGgtgagtgcc...	intron 26 19090bp	...tcctgaaaagGTAAT...	exon 23
exon 23 215bp	...TGCTAgtaagcaatc...	intron 27 1543bp	...tgtgtttagCAATA...	exon 24a
exon 24a 139bp	...TCTTGgtaaggatca...	0bp	-	exon 24b
exon 24b 242bp	-	intron 28 ?	...attgtacagATACA...	exon 25
exon 25 167bp	...AGCAGgtactggtgg...	intron 29 ?	...tatcttcttagATGAT...	exon 26
exon 26 99bp	...AGAAGgtgagtgga...	intron 30 1904bp	...ctcccatcagTATTT...	exon 27
exon 27 128bp	...GACAGgtgagcattt...	intron 31 2743bp	...cttctgcagGTTCA...	exon 28 1253bp

Tabelle 4: Exon-Intron-Struktur des *ranBP17*-Gens

Die Ermittlung der Exon-Intronübergänge, die Exonenzahl, sowie die Größenbestimmung von 18 Introns wurde durch die Sequenz von neun BAC-Klonen ermöglicht, die von dem DOE Joint Genome Institute (Walnut Creek, CA, USA) im Rahmen des Human-Genom-Projektes Chromosom 5 teilweise sequenziert wurden (Tab. 5).

BAC-Nummer	EMBL-Zugangsnummer
CTC-455F18	AC008514
CIT978SKB_45L16	AC010306
CITB-H1_2037I18	AC010362
CTD-2154H6	AC010406
CTD-2249B15	AC010454
CTB-33LB	AC0106574
CIT-HSPC_376I20	AC018753
CTD-212004	AC008815
CTB-77B1	AC021077

Tabelle 5: Klon- und Zugangsnummern von neun BAC-Klonen mit genomischen Anteil von *ranBP17*.

3.3.2 Lokalisation des *ranBP17*-Gens auf Chromosom 5

Die bisherige Lokalisierung des *ranBP17*-Gens beruhte auf einer In-situ-Hybridisierung des *pseudo-ubh-1*-Gens auf Chromosom 5q34, das innerhalb eines Introns von *ranBP17* liegt.

Durch eine Radiations-Hybridkarte, die über STS-Marker („Sequenced Tagged Sites“) von somatischen Zellhybriden erstellt wird, konnte die Lokalisation auf Chromosom 5q34 bestätigt werden (Abb.20). Den Ausgangspunkt solcher Radiations-Hybridkarten stellen somatische Zellhybriden aus Nager-DNA als Vektor und einzelnen Bruchstücken eines zu analysierenden humanen Chromosoms dar. Je nach Grösse der humanen Bruchstücke beinhalten ca. 80-100 dieser Zellhybriden ein komplettes Chromosom. Die aus den Zellhybriden isolierte DNA dient zur Bestimmung der Abstände zwischen STS-Markern, also exprimierter DNA-Sequenzen, die nur einmal auf diesem Chromosom vorkommen. Da die STS-Marker eine Grösse von ca. 100-500bp nicht übersteigt, können diese mittels PCR einfach amplifiziert werden. Auf diese Weise wird jeder Zellhybrid nach mehreren hundert, auf dem ganzen Chromosom verteilten STS-Markern gescreent. Dabei werden STS-Marker, die in unmittelbarer Nähe liegen, mit hoher Wahrscheinlichkeit immer auf einem chromosomalen Bruchstück gefunden. Je weiter die STS-Marker voneinander entfernt sind

um so geringer ist die Wahrscheinlichkeit, daß sie auf einem Bruchstück gefunden werden. Dieses Experiment wird mehrfach mit neu hergestellten Zellhybriden durchgeführt. Dies wird solange wiederholt bis jeder STS-Marker zu einem anderen STS-Marker gekoppelt ist. Die Vielzahl und die Verteilung der STS-Marker auf dem ganzen Chromosom ermöglicht so die Erstellung einer Chromosomenkarte.

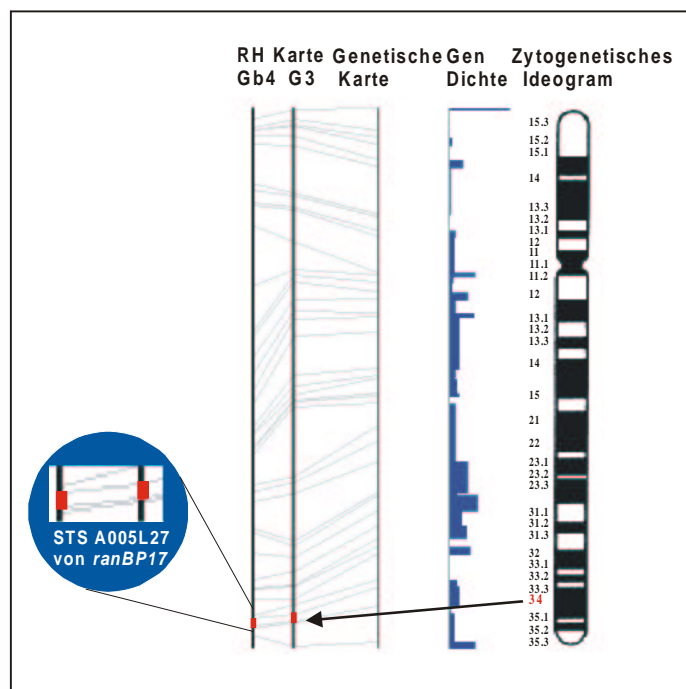


Abbildung 20:
Lokalisation des *ranBP17*-Gens auf Chromosom 5q34 mittels STS-Marker auf einer Radiations-Hybridkarte

Durch *ranBP17* homologe ESTs konnte ein STS-Marker gefunden werden, der auf Chromosom 5q34 lokalisiert ist (Abb.20). Der gefundene STS-Marker A005L27 wurde von den Instituten Genethon und Sanger Centre erstellt. Genethon hat dabei ein Zellhybridspektrum mit einer größeren Insertlänge gescreent und nennt die erstellte Hybridkarte GB4. Die von dem Sanger-Institut erstellte G3-Hybridkarte hat ein Zellhybridspektrum mit einer kleineren Insertlänge.

3.3.3 Lage des *ranBP17*-Gens zum Bruchpunkt der t(5;14)(q34;q11)

Zur Abklärung der Lage des *ranBP17*-Gens zum Bruchpunkt der t(5;14)(q34;q11) von Patient 1, wurden achtzehn verschiedene PAC-Klone mittels PCR analysiert. Die Klone wurden aus der humanen PAC-Bibliothek RPCI1,3-5 von dem Ressourcenzentrum des deutschen Humangenomprojekts in Berlin bezogen, die mittels PCR auf *pseudo-ubh-1* gescreent wurde. Die Position von *pseudo-ubh-1* in der Nähe des t(5;14)-Bruchpunktes war bekannt. Durch

PCR mit *ranBP17*-spezifischen Primern sollte festgestellt werden auf welchem dieser PAC-Klone das *ranBP17*-Gen liegt (Abb.21).

Das Primerpaar hito592s/hito685r aus Exon 22 (A) ergibt ein Amplifikat von ca. 90bp, das Primerpaar hito1071s/hito1141r aus den Exonen 24a/25 (B) ergibt ein Amplifikat von ca. 70bp. Außer den Klonen in Spur17 und 18 wurden alle Ansätze doppelt durchgeführt.

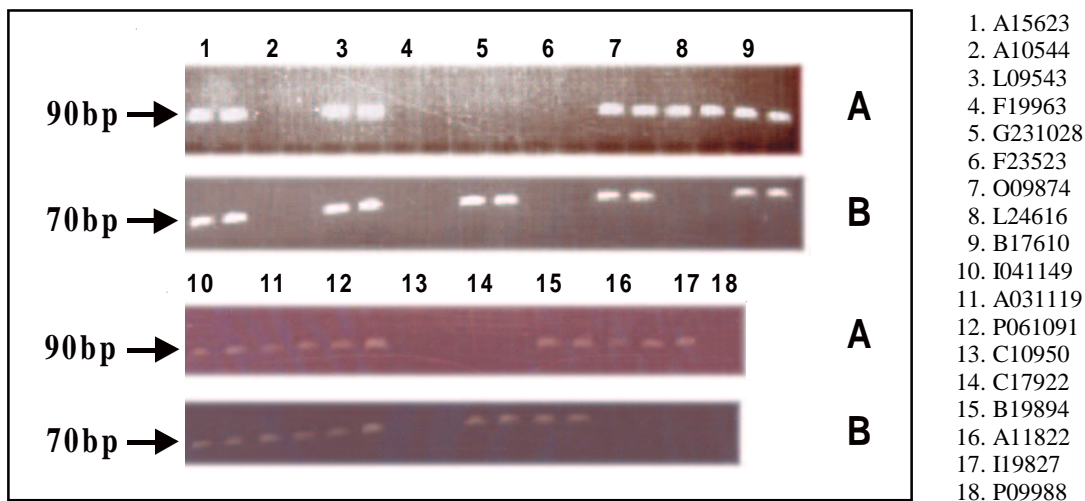


Abbildung 21: PCR von PAC-Klonen mittels *ranBP17*-spezifischer Primer aus der humanen Bibliothek RPCI1,3-5. A: hito592s/hito685r B: hito1071/hito1141r

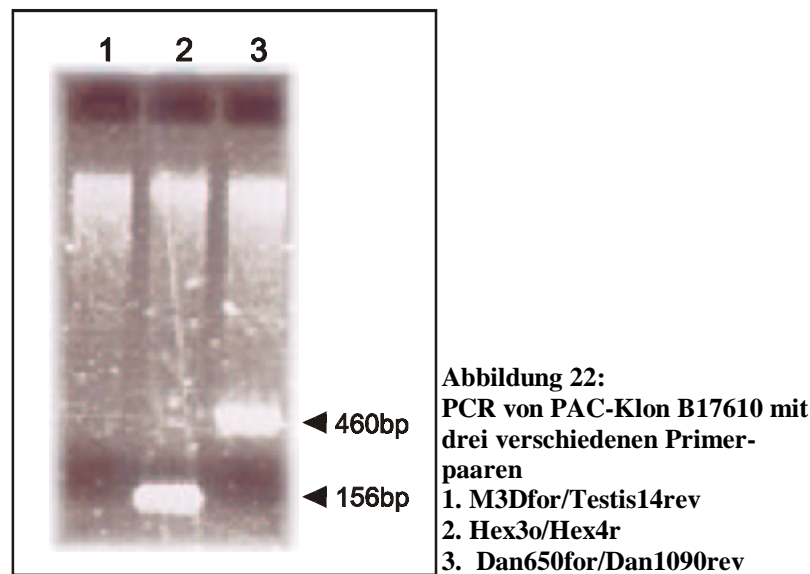
Für das Primerpaar A sind elf, für das Primerpaar B sind zehn Klone positiv. Fünf Klone sind für beide Primerpaare negativ und wurden für die Folgeversuche nicht mehr verwendet. Die verbleibenden Klone tragen *pseudo-ubh-1* und zumindest teilweise *ranBP17*.

Als nächstes mußte geklärt werden, welche Klone auch die Region in unmittelbarer Nähe des Bruchpunktes in sich tragen. Durch Sequenzierung eines PAC-Klones, der beide Marker (Bruchpunktregion von Chromosom 5q34 und Exon 25) in sich trägt, kann man die Lage des *ranBP17*-Gens zum t(5;14)-Bruchpunkt 1 festlegen. Von sechs verschiedenen PAC-Klonen wurden mit je drei Primerpaaren eine PCR durchgeführt:

1. M3Dfor/Testis14rev: 271bp (5'-translatierte Region von *ranBP17*)
2. Hex3o/Hex4rev: 156bp (3'-translatierte Region von *ranBP17*)
3. Dan 650f/Dan1090r: 460bp (direkt am t(5;14)-Bruchpunkt)

Für die PCR mit 35 Zyklen wurden je 1µg Template DNA eingesetzt. Die Annealingtemperatur betrug 56°C.

Als einziger von den getesteten PAC-Klonen konnte in B17610 das *ranBP17*-spezifische 3'-Fragment und das 460bp lange Bruchpunktfragment nachgewiesen werden. Das 271bp lange 5'-Fragment von *ranBP17* liegt nicht auf diesem Klon. Dieser Klon wurde zur Bestimmung der Lage von *ranBP17* zum Bruchpunkt mittels Sequenzierung eingesetzt (Abb.22).



3.3.4 Sequenzierung des PAC-Klons B17610 von Chromosom 5

Von zwei der vier ALL-Patienten mit einer t(5;14) (Whitlock et al., 1994) konnte der Bruchpunkt kloniert und sequenziert werden (Hansen-Hagge et al., 1998). Mit Hilfe dieser Sequenzen, eines PCR-positiven PAC-Klones sowie genomischer Sequenzen aus der Gendatenbank, konnte die Lage des *ranBP17*-Gens zu diesen beiden Bruchpunkten bestimmt werden.

Mit dem Klon B17610 wurde eine Primerwalking-Sequenzierung mit den Bruchpunktprimern von Patient 1 Dan650f/Dan1090r (genomisch von Chromosom 5) und den genspezifischen Primern Hex3o/Hex4r (Exon 25) durchgeführt. Insgesamt konnten so 6.5kb sequenziert werden. Das 3.8kb große *pseudo-ubh-1* konnte durch die Sequenzierung in einer Entfernung von 2903bp vom Bruchpunkt gefunden werden. Dadurch wurde eine genomische Sequenz von ca. 10kb gebildet. Durch eine genomische BLAST-Suche mit diesem 10kb-Fragment, konnte der BAC-Klon CIT978SKB_45L16 (AC010306) von Chromosom 5 identifiziert werden. Dieser Klon wird im Rahmen des Humangenomprojekts vom DOE Joint Genome Institute (Walnut Creek, Kalifornien, USA) sequenziert. Der noch nicht komplett sequenzierte Klon wird in durchsequenzierte Contigs unterteilt. In einem Contig dieses Klons von 19107bp konnten *pseudo-ubh-1*, die Bruchpunktregion 1 und das Exon 25 von *ranBP17* gefunden und in Relation gesetzt werden (Abb.23).

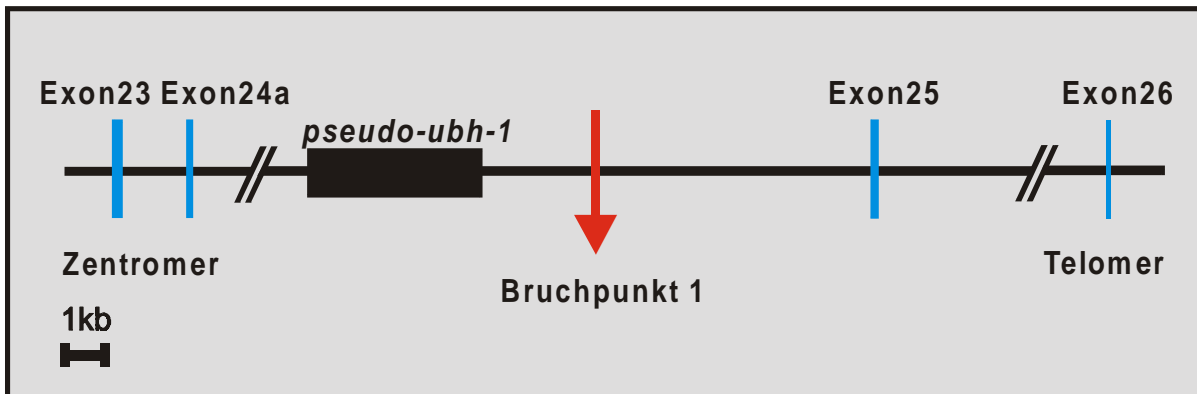


Abbildung 23: Lokalisation des Bruchpunktes 1 bei einem ALL-Patienten auf Chromosom 5q34 mit einer t(5;14) (q34;q11) zu dem *ranBP17*-Exon 25 und *pseudo-ubh-1*, durch Sequenzierung von PAC B1760 und BAC-Contig CIT978SKB_45L16.

Durch die Translokation t(5;14) beim Patienten 1 bricht das *ranBP17*-Gen im Intron zwischen Exon 24a und Exon 25 auseinander. Die Exone 1-24a sowie *pseudo-ubh-1* verbleiben auf Chromosom 5q34, während die Exone 25-28 zum Chromosom 14q11 in unmittelbare Nähe der D δ 2-Region des T-Zellrezeptors translozieren. Reziprok dazu, wird der chromosomale 14q11-Anteil ab der J δ 1-Region an das Chromosom 5q34 in die Nähe von Exon24a transloziert.

Die Lagebestimmung des Bruchpunktes eines zweiten Patienten zum *ranBP17*-Gen, konnte durch eine BLAST-Homologiesuche mit der Bruchpunktregion und dem Exon 28 bestimmt werden. Der BAC-Klon CTD-2249B15 (AC010454) beinhaltet in einem durchsequenzierten Contig das Exon 28 und den Bruchpunkt von Chromosom 5 dieses Patienten. Das *ranBP17*-Gen wird dabei nicht wie bei Patient 1 im ORF auseinandergebrochen, sondern verbleibt von Exon 1-28 auf Chromosom 5q34. Der Bruchpunkt 2 liegt 8030bp in 3'-Richtung von Exon 28 entfernt (Abb.24).

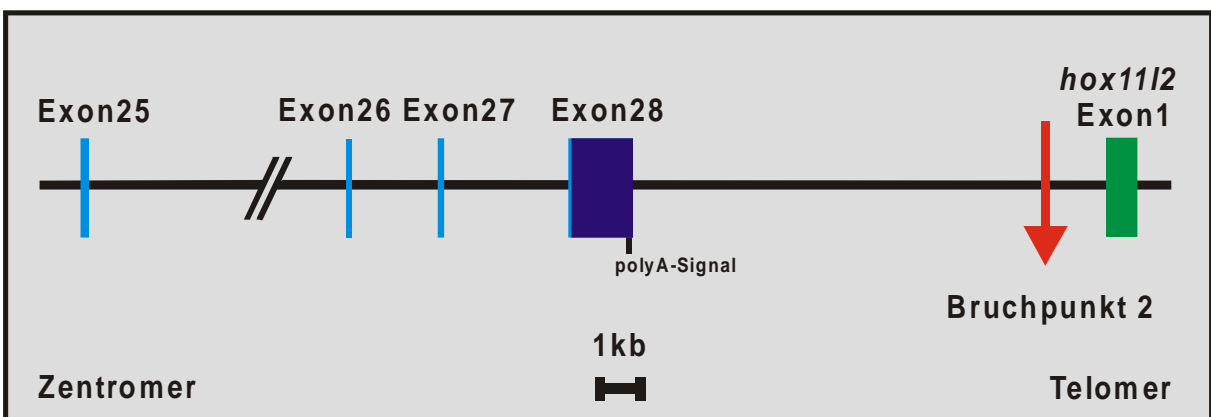


Abbildung 24: Lokalisation des Bruchpunktes bei Patient 2 mit einer ALL und t(5;14)(q34;q11) zu Exon 28 von *ranBP17*.

In diesem Contig konnte ebenfalls das Exon 1 des Homeobox-Gens *hox11l2* (Gonzales-Sarmiento, 1998, AJ223798) identifiziert werden. Dieses liegt auf der anderen Seite des Bruchpunktes 1212bp telomerwärts entfernt.

Aus den genomischen Sequenzierungen, genomischen BLAST-Homologievergleichen und den Bruchpunktsequenzen der beiden Patienten konnten die exakten Orientierungen von *ranBP17*, *hox11l2* und dem TCR δ im Rahmen der reziproken t(5;14) Translokation bei beiden Patienten bestimmt werden (Abb.25).

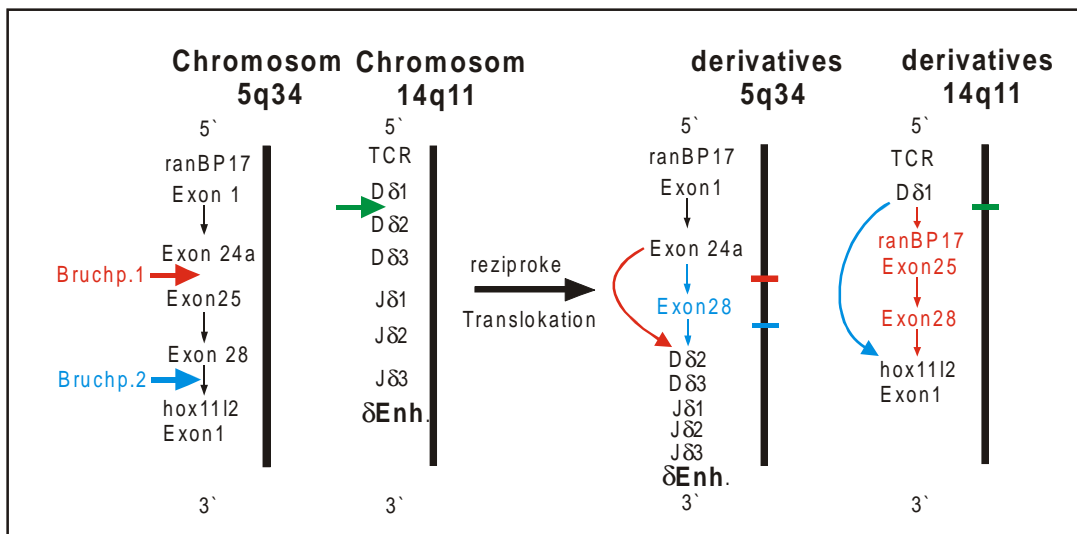


Abbildung 25: Translozierte Exone von *ranBP17*, *hox11l2* und D δ /J δ -Regionen des TCR δ bei zwei reziproken t(5;14) Translokationen.

3.4 Western Blot Analysen

3.3.1 Induktion eines GST/RanBP17-Fusionsproteins

Ein polyklonaler RanBP17-spezifischer Antikörper wurde mittels des carboxyterminalen AA-Peptids **C-RDVAEALRSDGNTEP** (AA 1114-1128) in Kaninchen hergestellt.

Zur Analyse der Funktionsfähigkeit dieses Anti-RanBP17-Peptidantikörpers wurden die letzten, im 3'-ORF liegenden 710bp der *ranBP17*-cDNA-Sequenz, in einen induzierbaren Prokaryonten-Expressionsvektor kloniert. Dazu wurde mittels PCR ein cDNA-Fragment amplifiziert, daß am äußersten 3'-Ende des ORF liegt. Durch einen Sense-Primer mit einer BamHI-Schnittstelle und einen Antisense-Primer mit einer EcoRI-Schnittstelle konnte das 710bp große Amplifikat in den GST-Vektor pGEX-2T über BamHI/EcoRI kloniert werden. Die Transformation erfolgte dabei in den Protease-defizienten *E. coli*-Stamm BL21. Nach der Induktion des GST/RanBP17-Fusionsproteins mittels 0.7mM IPTG, wurden 10 μ l der

Bakterienkultur nach Denaturierung für 5min. bei 95°C auf ein 10%-SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

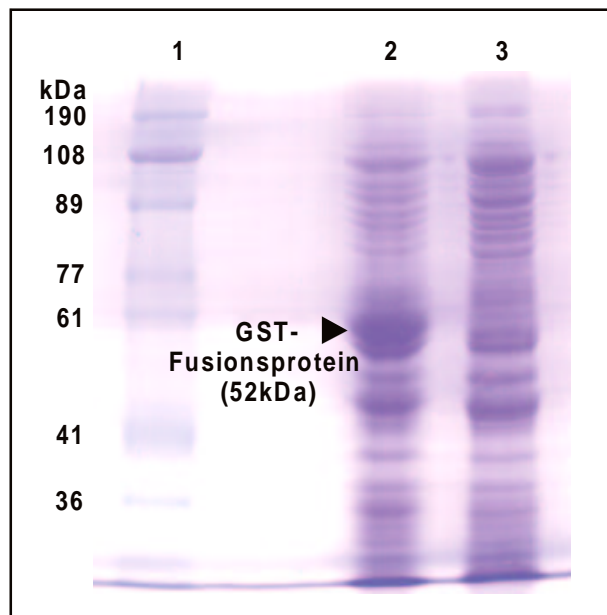


Abbildung 26: PAGE einer GST-Fusionsprotein
Bakterienkultur 1. Marker 2. Induzierte Kultur
3. Nicht-induzierte Kultur

Nach Anfärbung der Proteine mit Coomassie-Blau konnte man bei der induzierten Bakterienkultur eine deutliche Bande bei 52kDa erkennen (Abb.26). Bei der nicht-induzierten Kultur sind nur die Bakterienproteine zu sehen. Die 52kDa Bande stellt das GST-Fusionsprotein dar, das sich aus dem 27kDa GST-Protein und dem 25kDa RanBP17-Peptid zusammensetzt. Die erfolgreiche Induktion mittels IPTG war damit nachgewiesen.

3.4.2 Western Blot eines GST/RanBP17-Fusionsproteins

Der polyklonale Peptid-Antikörper für RanBP17 wurde auch mittels Western Blot überprüft. Dazu wurden zwei Bakterienkulturen, die das RanBP17/GST-Plasmid mit einem IPTG-induzierbarem Promotor in sich tragen verwendet. Durch Induktion mittels IPTG sollte eine Kultur das Fusionsprotein synthetisieren. Die zweite Bakterienkultur wurde als Kontrolle nicht induziert. Im Western Blot sollte der RanBP17-Antikörper bei der induzierten Kultur ein 52kDa großes Protein erkennen. Die nicht induzierte Kultur sollte kein Ergebnis liefern. Die Kontrollfärbung mit dem monoklonalen Anti-GST-Antikörper sollte durch Erkennung des GST-Anteils des Fusionsproteins, das gleiche Ergebnis liefern. Hier sollte ebenfalls das

52kDa große Signal, allerdings durch Bindung an den GST-Anteil, zu erkennen sein. Für beide Antikörper wurden die gleichen Konzentrationen und Inkubationszeiten eingesetzt.

Bei der Anti-RanBP17-Färbung ist das Fusionsprotein mit 0.5µl der induzierten Bakterienkultur als eine definierte Bande zu sehen (Abb.27). Eine Hintergrundfärbung von Bakterien-Proteinen ist erst beim doppelten Volumen (1.0µl) zu erkennen. Die Anti-GST-Färbung zeigt dagegen, aufgrund einer geringeren Spezifität, keinen wesentlichen Unterschied in der Anfärbung bei 0.5µl und 1.0µl des Anti-GST-Antikörpers. Dieser färbt auch bei einer geringer aufgetragenen Menge andere Proteine an. Spezifischer ist der RanBP17-Antikörper, der bei geringerer Menge nur RanBP17 erkennt. Die nicht induzierte Kultur zeigt bei der 10fach aufgetragenen Menge mit beiden Antikörpern eine spezifische und unspezifische Anfärbung. Dies erfolgt aufgrund einer Induktor-unabhängigen Transkription des IPTG-Promotors.

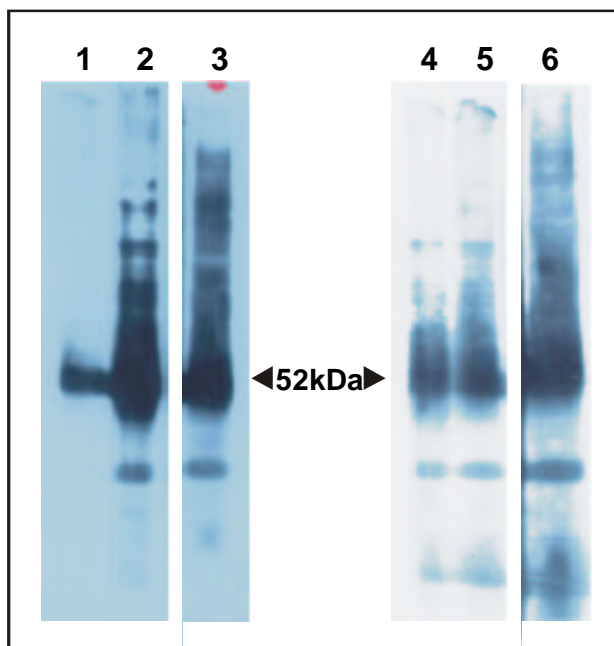


Abbildung 27: Western Blot einer induzierten und nicht-induzierten GST/RanBP17-Bakterienkultur mit Anti-RanBP17 und Anti-GST-Antikörper.

1. Anti-RanBP17 (0.5µl) -induziert-
2. Anti-RanBP17 (1.0µl) -induziert-
3. Anti-RanBP17 (10µl) -nicht-induziert-
4. Anti-GST (0.5µl) -induziert-
5. Anti-GST (1.0µl) -induziert-
6. Anti-GST (10µl) -nicht-induziert-

3.5 Southern Blot Analyse zur evolutionären Konservierung des *ranBP17*-Gens

Zur Überprüfung der evolutionären Konservierung des *ranBP17*-Gens wurde ein genomischer Zoo-Blot mit der Sonde 513 (Exon 23-25) hybridisiert (Abb.28).

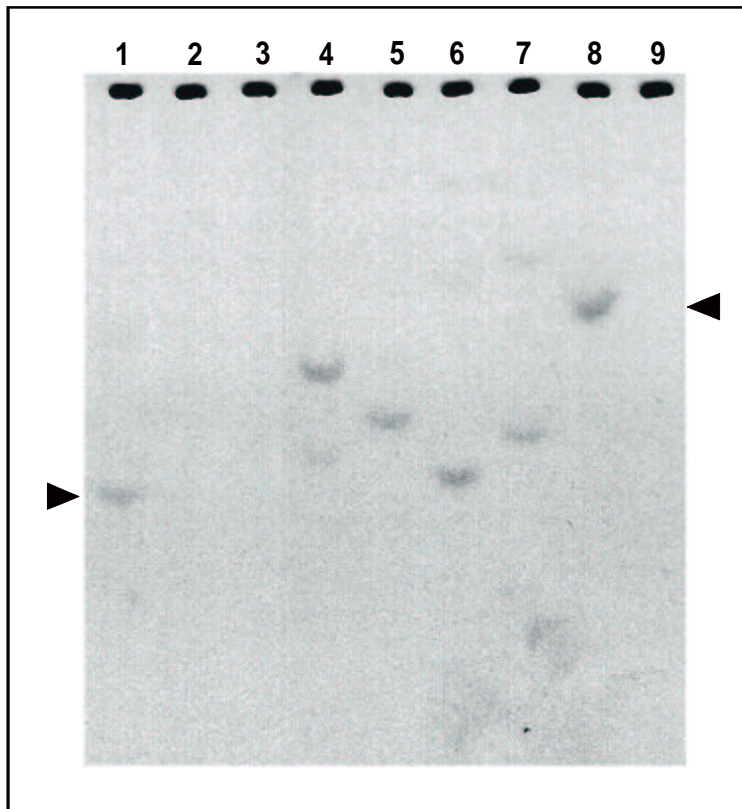
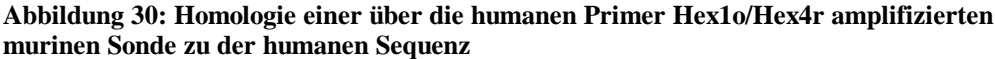


Abbildung 28:
Genomischer Zoo-Blot mit der Sonde 513 von *ranBP17* hybridisiert.

- | | |
|-----------|--------------|
| 1. Mensch | 6. Rind |
| 2. Affe | 7. Kaninchen |
| 3. Ratte | 8. Huhn |
| 4. Maus | 9. Hefe |
| 5. Hund | |

Nach Exposition von 7 Tagen wurde sichtbar, daß das *ranBP17*-Gen bis zum Huhn konserviert ist. Möglicherweise ist die DNA-Sequenz der eingesetzten Sonde auf dem Affen-Genom nicht enthalten oder weicht so stark ab, daß keine Hybridisierung stattfindet. Eine Gen-Datenbanksuche mit dem humanen *ranBP17* zeigte eine Konservierung des Gens bis zum Fadenwurm *C. elegans*. Das *c35a5.8*-Gen von *C. elegans* ist mit 41% zu dem humanen *ranBP17* homolog.

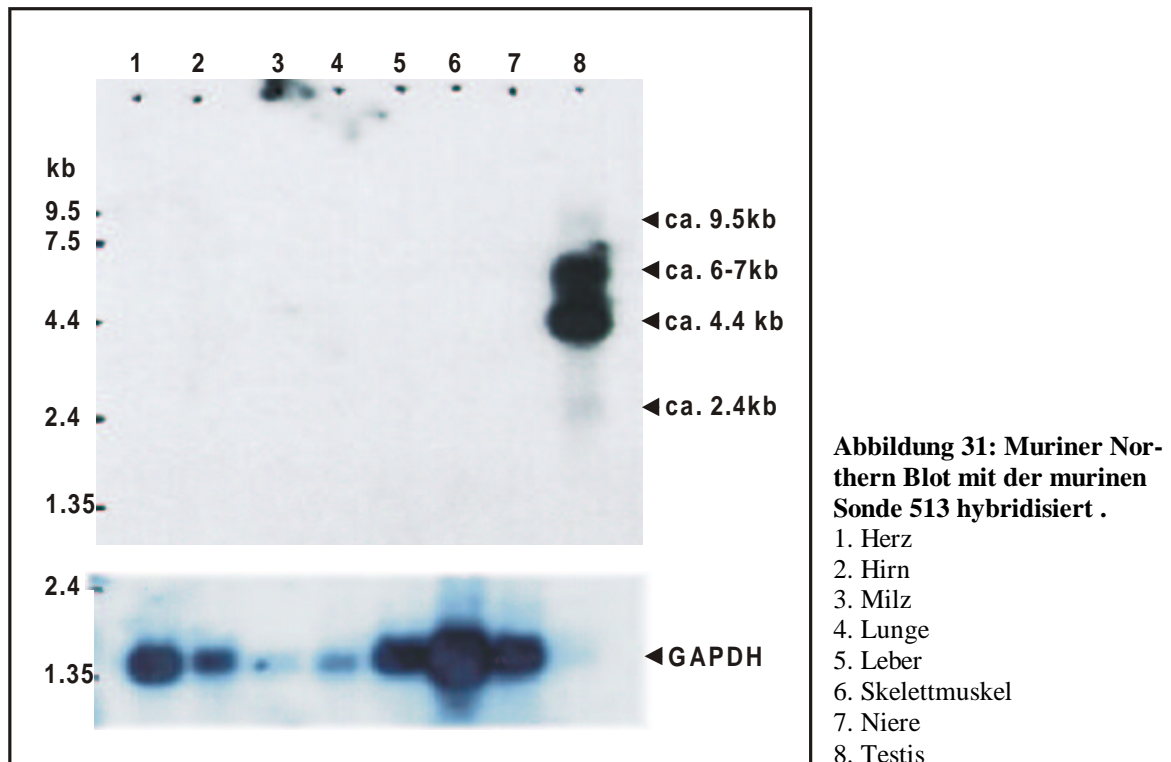


Zur weiteren Überprüfung der Homologie zwischen humanem und murinem *ranBP17*-Gen wurde eine murine Testis cDNA-Bibliothek mit der murinen Sonde 513 hybridisiert. Drei *ranBP17*-positive Klone mit den Insertgrößen 768bp, 923bp und 600bp konnten ermittelt werden.

76

3.6.3 Northern Blot Analyse verschiedener muriner Gewebe

Zur Untersuchung des Expressionsmusters bei der Maus wurde ein polyA⁺-Northern Blot mit der murinen Sonde 513 hybridisiert. Nach einer sehr kurzen Expositionszeit von 6h wurden zwei starke Signale bei ca. 4.4kb und ca. 6-7kb und weiterhin zwei schwache Signale bei ca. 9.5kb und 2.4kb in Testis sichtbar (Abb.31).



Eine Erhöhung der Expositionszeit ließ die schwächeren Signale deutlicher hervortreten. Die homologe Sonde 513 erkannte in humanem Testisgewebe nur zwei Transkripte, die murine Sonde hybridisiert dagegen mit vier Transkripten. Auffällig ist, daß in der Maus wie beim Menschen vier *ranBP17* Transkripte exprimiert werden.

3.7 Identifizierung des *ranBP17* homologen Gens *ranBP16*

Während der Klonierung des humanen *ranBP17*-Gens konnten durch eine EST-Datenbanksuche mehrere ESTs identifiziert werden, die eine ca. 65%ige Homologie zu *ranBP17* aufwiesen. Dies deutete auf die Existenz eines *ranBP17* verwandten Gens hin. Anhand der gefundenen ESTs konnte ein kleines cDNA-Fragment erstellt werden, das zur Klonierung dieses Gens durch cDNA-Screening dienen sollte. Im Laufe der Screening-

Experimente wurde in der EMBL-Datenbank eine cDNA-Sequenz veröffentlicht, die bis auf ein 540bp langes Fragment, 100% identisch mit der von uns klonierten Sequenz ist (KIAA0745, Acc.Nr. AB018288; Nagase et al., 1998). Anhand einer Radiations-Hybridkarte konnten wir das humane Gen auf Chromosom 8p11-12 lokalisieren. Nach Beendigung der Klonierung dieses Gens konnten wir durch eine Gendatenbanksuche die komplette cDNA mit dem 540bp-Fragment und einem Startcodon finden (*ranBP16*, Acc. Nr. Af064729). Weiterhin konnten wir das murine *ranBP16* klonieren, dessen Protein eine 66.1%ige Homologie zu dem humanen RanBP17 aufweist.

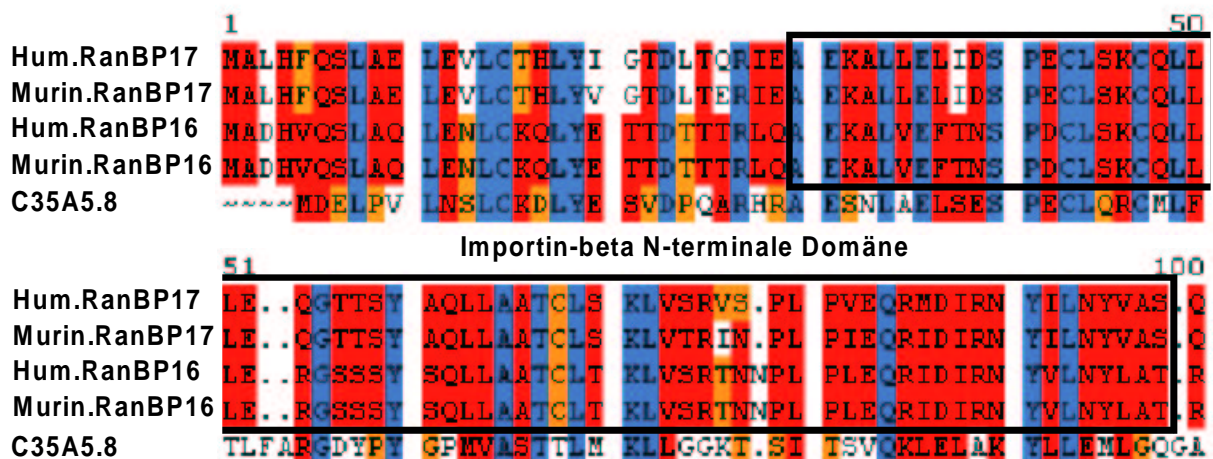
3.8 Homologievergleich des RanBP17-Proteins

Ein Protein, das von niederen Organismen bis zum Menschen konserviert ist, deutet auf seine wichtige Funktion hin (Tab.6). Die Analyse der Motif- und Domänenstruktur sollte näheren Aufschluß über die bisher nicht charakterisierte Funktion von RanBP17 und RanBP16 geben.

	Homologie zu humanem RanBP17	Molekulargewicht
1. Murines RanBP17	93.8%	124kDa
2. Humanes RanBP16	66.8%	123kDa
3. Murines RanBP16	66.1%	123kDa
4. C35A5.8 (<i>C. elegans</i>)	39.1%	127kDa

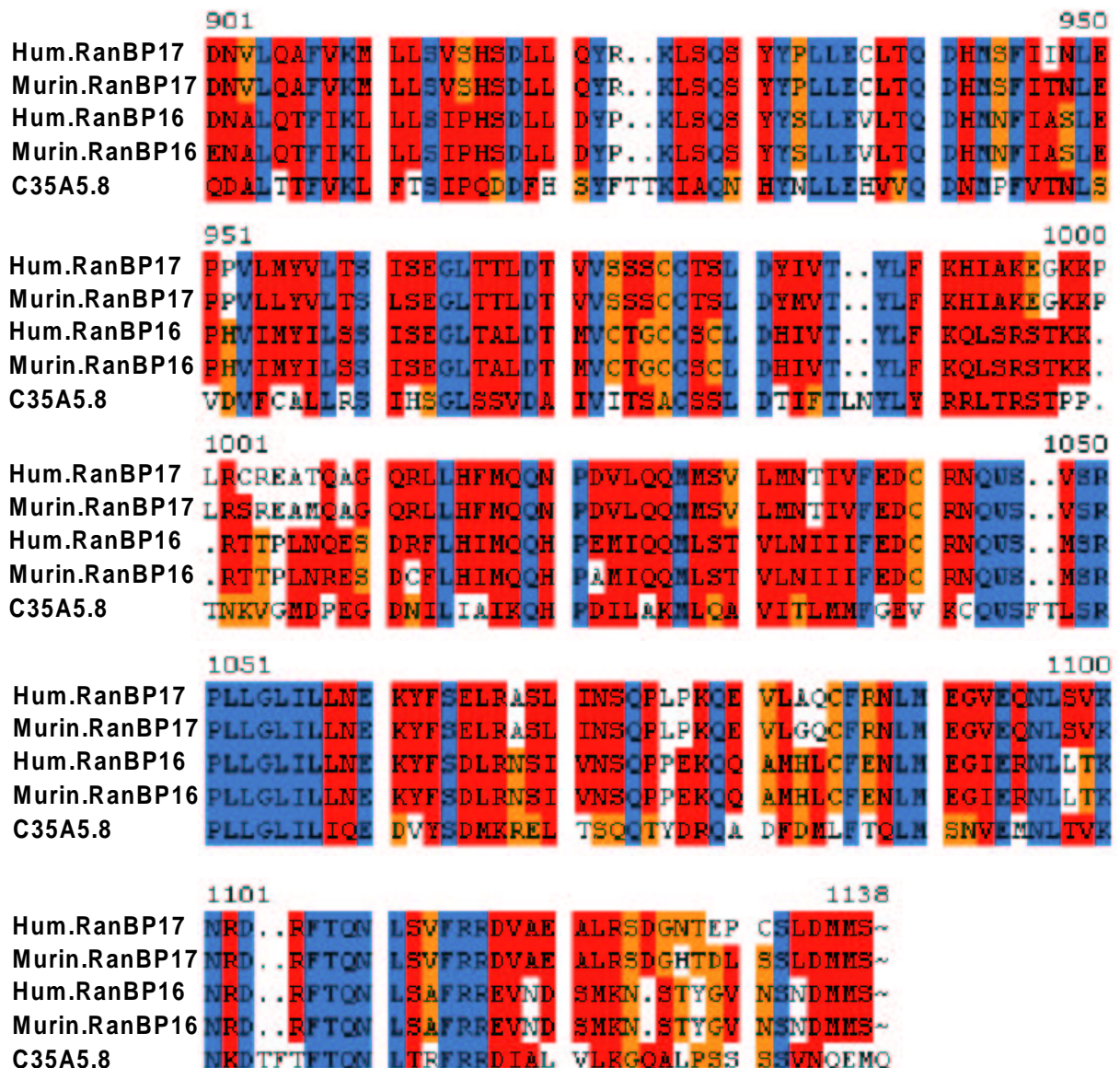
Tabelle 6: Homologievergleich derAA-Sequenzen von fünf homologen Proteinen

Mit dem Alignment-Programm ClustalW wurden die fünf Aminosäuresequenzen gegenüber gestellt und nach der Stärke der Homologie unterschiedlich mit Farben unterlegt (Abb.32).



	101			150
Hum.RanBP17	PKLAPFVIOA	LI..QVIAKI	TKLGWFEVQ.KD QFVFREIIAD
Murin.RanBP17	PKLAPFVIOA	LI..QVIAKL	TKLGWFEVQ.KD EFVFREIIAD
Hum.RanBP16	PKLATFVTQA	LI..QLYARI	TKLGWFDCC.KD DYVFRNAITD
Murin.RanBP16	PKLATFVTQA	LI..QLYARI	TKLGWFDCC.KD DYVFRNAITD
C35A5.8	PQFPPLVTS	LFTCQLFARL	TRQENTYQNP	TENQTEDTKI EYPFRDPVDS
	151			200
Hum.RanBP17	VKKFL.QGTV	FHCIIGVIL	S..ELTQEMV	LVDYSRPSAK HRKIATSFRD
Murin.RanBP17	VKKFL.QGTV	FHCIIGVIL	C..ELTQEMV	LVDYSRPSAK HRKIATSFRD
Hum.RanBP16	VTRFL.QDSV	FYCIIGVTIL	S..QLTNEIV	QADTTHTPLTK HRKIASSFRD
Murin.RanBP16	VTRFL.QDSV	FYCIIGVTIL	S..QLTNEIV	QADTTHTPLTK HRKIASSFRD
C35A5.8	LVKTINMDNI	FESMLAQQL	TLFTLVADNV	SASGMDSVNF HRKNLSQFRD
	201			250
Hum.RanBP17	TSLKDVLVLA	CSLLKEVFAK	PLNLQDQCQQ	NLVVMQVLRKV LN..CLNFD
Murin.RanBP17	TSLKDILVLA	CSLLKQVLAK	PLNLQDQCQQ	SLVMQVLRKV LS..CLNFD
Hum.RanBP16	SSLFDIFTLS	CNLLKQASGK	NLNLNDESCH	GLLMQLLKLT HN..CLNFD
Murin.RanBP16	SSLFDIFTLS	CNLLKQASGK	NLNLNDESCH	GLLMQLLKLT HN..CLNFD
C35A5.8	DFLYEIFSVS	LNVLNDNVDR	..NLNDR..QL	GLLHAFVILN LNLQCLLFDY
	251			300
Hum.RanBP17	IGSSADESAD	DLCTVQIPTT	WRTIFLEPET	LDLFFNLVYHS LPPLLS..QL
Murin.RanBP17	LGSSADESAD	DLCTVQIPTT	WRTIFLEPET	LDLFFNLVYHS LPPLLS..QL
Hum.RanBP16	IGTSTDSSD	DLCTVQIPTS	WRSAFLDSS	LQLFFDLVYHS IPPSFS..PL
Murin.RanBP16	IGTSTDSSD	DLCTVQIPTS	WRSAFLDSS	LQLFFDLVYHS IPPSFS..PL
C35A5.8	IGSLTDETSE	DNCNVQIPTA	WRSFTDCKI	VQLMFKLLNV LPQESSEFTK
	301			350
Hum.RanBP17	ALSCLVQFAS	TRRSLFNSPE	RAKYLGNLIK	GVKRILENPQ GLSDPGNYHE
Murin.RanBP17	ALSCLVQFAS	TRRSLFSSPE	RAKYLGNLIK	GVKRILENPQ GLSDPGNYHE
Hum.RanBP16	VLSCLVQIAS	VRRSLFNNAE	RAKFLSHLVD	GVKRILENPQ SLSDPNNYHE
Murin.RanBP16	VLSCLVQIAS	VRRSLFNNAE	RAKFLSHLVD	GVKRILENPQ SLSDPNNYHE
C35A5.8	VMTTIAQLAS	IRRTLFGNGE	RQATVQKLVE	GVVSVIENPG KLSDAQAFHE
	351			400
Hum.RanBP17	FCRFLARL..	KTNYQLGELV	MYKEYPEVIR	LIANFTITSL QHWEFAPNSV
Murin.RanBP17	FCRFLARL..	KTNYQLGELV	LVKEYAEVIG	LIANFTITSL QHWEFAPNSV
Hum.RanBP16	FCRLARL..	KSNYQLGELV	KVENYPEVIR	LIANFTVTSL QHWEFAPNSV
Murin.RanBP16	FCRLARL..	KSNYQLGELV	KVENYPDVIR	LIANFTVTSL QHWEFAPNSV
C35A5.8	FCRLIARLFT	KTNYQLCELI	ANPCYSHMLR	LLAEFTVQSL RMMEFSANST
	401			450
Hum.RanBP17	HYLLTLWQRM	VASVPFVK..	STEPHLLDTY	APEITKAFIT SRLDSVAIVV
Murin.RanBP17	HYLLTLWQRM	VASVPFVK..	SAEPHLLDTY	APEITKAFIT SRLDSVAIVV
Hum.RanBP16	HYLLSLWQRL	AASVPFVK..	ATEPHMLETY	TPEVTKAYIT SRLDSVHILL
Murin.RanBP16	HYLLSLWQRL	AASVPFVK..	ATEPHMLETY	TPEVTKAYIT SRLDSVHILL
C35A5.8	YFLMTFWQRM	VTSPVYWRNF	TNDEHLLNVY	CPEIMTAFVE SRLQHVESIV
	451			500
Hum.RanBP17	RDHLDDPLDD	TATVFOQLEQ	LCTVSRCEYE	KT..CALLVQ LFDQNAQNYQ
Murin.RanBP17	RDNLDDPLDD	TATVFOQLEQ	LCTVSRCEYE	KT..CTLLVQ LFDQNAQNYQ
Hum.RanBP16	RDGLEDPLED	TGLVQQQLDQ	ISTIGRCEYE	KT..CALLVQ LFDQSAQSYQ
Murin.RanBP16	RDGLEDPLED	TGLVQQQLDQ	ISTIGRCEYE	KT..CALLVQ LFDQSAQSYQ
C35A5.8	REGAENPLDD	QGATLQVMEH	LAIICRCEYE	FINTCKLLTQ HFDQMAN...

	501				550
Hum.RanBP17	KLLHPYSGVT	VDITIQEGR	ANLVYLVGTV	VGGRLTYTST	DEHD...AMDG
Murin.RanBP17	KLLHAAPGLA	VDMAIQEGR	ANLIYLVGTV	VGGRLTYTST	DEHD...AMDG
Hum.RanBP16	ELLQSASASP	MDIAVQEGRL	TULVYIIGAV	IGGRVSFAST	DEQD...AMDG
Murin.RanBP16	ELLQSASASP	MDIAVQEGRL	TULVYIIGAV	IGGRVSFAST	DEQD...AMDG
C35A5.8	.IWMNGSEND	ANTAIQEGRL	VNLITLIGTA	VFGKTTATSS	DVHDKFTMDG
	551				600
Hum.RanBP17	ELSCRVFQLI	SLMDTGLPRC	CNEKIELAIL	WFLDQFRKTV	VGDQLQRTSK
Murin.RanBP17	ELSCRVFQLI	SLMDTRLPHC	TNEKIELAVL	WFLDQFRKTV	VGDQLQRTSK
Hum.RanBP16	ELVCRVLQLE	NLTDSRLAQA	GNEKLELAML	SFFEQFRKIY	IGDQVQKSSK
Murin.RanBP16	ELVCRVLQLE	NLTDSRLAQA	GNEKLELAML	SFFEQFRKIY	IGDQVQKSSK
C35A5.8	ELIAR.....FPLK	GNLRLEVSEFI	HMLEQFRRAY	IMDQITRASA
	601				650
Hum.RanBP17	VYARMSEVLG	ITDDN...HVL	ETFMTKIIVTN	LKYUGRYEPV	ISRTLQFLND
Murin.RanBP17	VYARMSEVLG	ITDDN...HVL	ETFMTKIIVTN	LKYUGRCEPV	ISRTLQFLSD
Hum.RanBP16	LYRRLSEVLG	LNDDET...HVL	SVFIGIKIITN	LKYUGRCEPI	TSKTLQLLND
Murin.RanBP16	LYRRLSEVLG	LNDDET...HVL	SVFIGKVIITN	LKYUGRCEPI	TSKTLQLLND
C35A5.8	VYDTLEAELR	ITEESDMFTL	GVIVQKILTN	LKFUPSNSDL	LDLSLSLFLKD
	651				700
Hum.RanBP17	LSVGYILLKK	LVKIDAVKFM	LKNHTSEHFP	FLGISDNHSL	SDFRCRTTFY
Murin.RanBP17	LSVGYILLKK	LVKIDAVKFM	LKNHTSEHFP	FLGISETYNV	GDFRCRTTFY
Hum.RanBP16	LSIGYSSVRK	LVKLSAVQFM	LNNHTSEHFS	FLGINNQSNL	TDMRCRTTFY
Murin.RanBP16	LSIGYSSVRK	LVKLSAVQFM	LNNHTSEHFS	FLGINNQSNL	TDMRCRTTFY
C35A5.8	LSLGYSAVRK	LFRLPEWQLL	LNNHTADHFT	FMFLGPNIDY	QTMKQRTTFY
	701				750
Hum.RanBP17	TALTRLLMVD	LGEDEDEFEN	FMLPLTVAFE	TVLQIFNNN.FKQEDV
Murin.RanBP17	TALTRLLMVD	LGEDEDEFEN	FMLPLTVSFE	TVLQIFNNN.FKQEEV
Hum.RanBP16	TALGRLLMVD	LGEDEDQYEQ	FMLPLTAAFE	AVAQMFSTNSFNEQEA
Murin.RanBP16	TALGRLLMVD	LGEDEDQYEQ	FMLPLTAAFE	AVAQMFSTNSFNEQEA
C35A5.8	EALTRLLTTD	YSDDEEMLQR	FLRPLTDTVE	GICTVIQNNF	TCQGVVEEQ
	751				800
Hum.RanBP17	KRMLIGLARD	LRGIAFALNT	KTSYTMFLDW	MYPTYLPLLQ	NAVERWYGEF
Murin.RanBP17	KRMLIGLARD	LRGIAFALNT	KTSYTMFLDW	IYPAYLPVLQ	RAIERWYGEF
Hum.RanBP16	KRTLVLGLVRD	LRGIAFAFNA	KTSFMMLFEW	IYPSYMPILO	RAIELWYHDP
Murin.RanBP16	KRTLVLGLVRD	LRGIAFAFNA	KTSFMMLFEW	IYPSYMPILO	RAIELWYHDP
C35A5.8	KKIITGLCRD	LRGVAIASST	KTIFQILFEW	MYPEVENIMQ	FSVEKWPQCA
	801				850
Hum.RanBP17	..TCTTPILK	LMAILMQNRS	QRLNFDVSSP	NGILLFREAS	KMVCTYGNQI
Murin.RanBP17	..ACTTPILK	LLAELMQNRS	QRLNFDVSSP	NGILLFREAS	KMICTYGNQI
Hum.RanBP16	..ACTTPVLK	LMAILVHNRS	QRLQFDVSSP	NGILLFRETS	KMITHYGNRI
Murin.RanBP16	..ACTTPVLK	LMAILVHNRS	QRLQFDVSSP	NGILLFRETS	KMITHYGNRI
C35A5.8	FTDVVTFILR	LLSEMVOQRQ	QRLKFEMSSC	SAVLLFKETS	KIVSIYGERL
	851				900
Hum.RanBP17	LSLGSLSKD.	.QIYPMKLEK	ISICYSALKS	ALCGNYVSFG	VFKLYGDNHF
Murin.RanBP17	LSLGSLSKD.	.KIYPMKLEK	ISICYSALKS	ALCGNYVSFG	VFKLYGDNHF
Hum.RanBP16	LTLGEVPKD.	.QVYALKLEK	ISICFSMLKA	ALSGSYVNFG	VFRLYGBDAL
Murin.RanBP16	LTLGEVPKD.	.QVYALKLEK	ISICFSMLKA	ALSGSYVNFG	VFRLYGBDAL
C35A5.8	LQLPEVSKDR	VFTYKERYEN	IGVIFLILKN	ALIGAYVPFG	VFRLYGDSC



= 100% der AA sind identisch
 = über 50% der AA besitzen ähnliche Eigenschaften
 = unter 50% der AA besitzen ähnliche Eigenschaften

Abbildung 32: Protein-Homologievergleich

Die Analyse der dargestellten AA-Sequenzen mit den Computer-Programmen Foldclass und Pepstats ermöglichte die Bestimmung der Anzahl und Art der Sekundärstruktur-Domänen, sowie den isoelektrischen Punkt und den Anteil der verschiedenen AA-Gruppen (Tab.7). Die Anzahl und die Art der Domänen eines Proteins lässt eine Abschätzung bzw. Voraussage über die vier Superklassen der Sekundärstruktur durch alpha-Helices und beta-Faltblattstrukturen zu (1. = alpha; 2. = beta; 3. = alpha*beta in einer Domäne; 4. = alpha und beta in verschiedenen Domänen). Die Einteilung in die verschiedenen Protein-Klassen wird durch die

AA-Sequenz bedingte Art und Anzahl der Domänen bestimmt (Pascarella and Argos, 1992; Reczko and Bohr, 1994; Reczko et al., 1994).

	Anzahl der Domänen	Superklasse	Isoelektrischer Punkt
Humanes RanBp17	10	beta	6.40
Murines RanBP17	9	beta	6.33
Humanes RanBP16	9	beta	6.27
Murines RanBP16	11	beta	6.23
C35A5.8	12	beta	5.19

Tabelle 7: Einteilung des RanBP17-Proteins und seinen Homologen über AA-Sequenz und Domänen

Das zu 39.1% homologe *C. elegans* Protein C35A5.8 weicht in der Klasse und dem isoelektrischen Punkt als Einziges in dieser Gruppe etwas ab.

Eine weitere Datenbanksuche mit den fünf Proteinsequenzen wurde mit dem Programm ProfileScan durchgeführt. Dabei wurde die PROSITE-Datenbank durchsucht, die sich aus Proteinfamilien und Domänen zusammensetzt. Diese Datenbank basiert auf der Tatsache, daß sich die meisten Proteine aufgrund von Sequenzähnlichkeiten in eine begrenzte Anzahl von Proteinfamilien einordnen lassen. Die die Proteinfamilien kennzeichnenden evolutionär konservierten Domänen ermöglichen die Einordnung eines neuen Proteins in eine solche Familie.

Außer bei *C. elegans* konnte bei den Proteinen eine Importinβ N-terminale Domäne gefunden werden. Diese Domäne ist bei den humanen und murinen RanBP17-Sequenzen 68AA, bei dem humanen und murinen RanBP16-Protein 69AA lang. Diese konservierte Region, die die Bindung an RanGTP an der Kernmembran vermittelt, weist auf die Zugehörigkeit zu den Kernrezeptorproteinen der Importinβ-Superfamilie hin. Das Programm PROSITE weist den erkannten Domänen in einer zu analysierenden AA-Sequenz einen Wert zu, der nach einem Algorithmus von Sibbald und Argos (1990) berechnet wird. Dieser Wert stellt die Homologie zu bekannten Domänen in der Datenbank dar. Die Werte der analysierten AA-Sequenzen zu der Importinβ-Domäne wird aus der Homologie zu den in der Datenbank befindlichen Domänen gebildet. Dabei werden nicht nur identische AA sondern auch verwandte AA berücksichtigt. Die Signifikanz für die Importinβ-Domäne beginnt bei einem Wert von 10.0. So besitzt das Importinβ-Protein beispielsweise einen Wert von 24.0. Für das humane

RanBP17-Protein liegt dieser Wert bei 8.1 sowie bei 8.4 für das murine RanBP17. Diese Analyse deutet auf eine, wenn auch entferntere Zugehörigkeit dieser beiden Proteine zu der Importin β -Superfamilie hin

3.8.1 Homologievergleich von RanBP17 zu CRM1

Durch einen Proteindomänenvergleich von RanBP17 mit den bekannten Kerntransportrezeptoren der Importin β -Familie, ergibt sich die größte Homologie mit dem Exportin CRM1 (chromosome region maintenance; Adachi and Yanagida, 1989; Tab.8).

Position in RanBP17	Domäne	Position in CRM1
30 - 95	Importin-beta N-terminal domain	46 - 112
-	Serum amyloid A protein	569 - 583
360 - 363	N-glycosylation site	262 - 265
641 - 644	N-glycosylation site	321 - 324
655 - 658	N-glycosylation site	485 - 488
779 - 782	N-glycosylation site	727 - 730
1049 - 1052	N-glycosylation site	-
1061 - 1064	N-glycosylation site	-
-	cAMP/cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site	752 - 755
25 - 27	Protein kinase C phosphorylation site	20 - 22
170 - 172	Protein kinase C phosphorylation site	264 - 266
179 - 181	Protein kinase C phosphorylation site	472 - 474
184 - 186	Protein kinase C phosphorylation site	477 - 479
250 - 252	Protein kinase C phosphorylation site	490 - 492
288 - 290	Protein kinase C phosphorylation site	684 - 686
414 - 416	Protein kinase C phosphorylation site	747 - 749
523 - 525	Protein kinase C phosphorylation site	750 - 752
568 - 570	Protein kinase C phosphorylation site	755 - 757
781 - 783	Protein kinase C phosphorylation site	885 - 887
1051 - 1053	Protein kinase C phosphorylation site	-
7 - 10	Casein kinase II phosphorylation site	61 - 64
179 - 182	Casein kinase II phosphorylation site	65 - 68
184 - 187	Casein kinase II phosphorylation site	113 - 116
233 - 236	Casein kinase II phosphorylation site	118 - 121
238 - 241	Casein kinase II phosphorylation site	277 - 280
415 - 418	Casein kinase II phosphorylation site	346 - 349
449 - 452	Casein kinase II phosphorylation site	358 - 361
486 - 489	Casein kinase II phosphorylation site	465 - 468
510 - 513	Casein kinase II phosphorylation site	632 - 635
531 - 534	Casein kinase II phosphorylation site	648 - 651
657 - 660	Casein kinase II phosphorylation site	-
874 - 877	Casein kinase II phosphorylation site	-
917 - 920	Casein kinase II phosphorylation site	-
923 - 926	Casein kinase II phosphorylation site	-
935 - 938	Casein kinase II phosphorylation site	-
-	Tyrosine kinase phosphorylation site	455 - 463
21 - 26	N-myristoylation site	155 - 160
500 - 505	N-myristoylation site	273 - 278

Ergebnisse

536 - 541	N-myristoylation site	486 - 491
651 - 656	N-myristoylation site	502 - 507
726 - 731	N-myristoylation site	812 - 817
829 - 834	N-myristoylation site	965 - 970
843 - 848	N-myristoylation site	-
1045 - 1050	N-myristoylation site	-
951 - 954	Amidation site	-
272 - 282	Prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site	-

Tabelle 8: Vergleich der AA-Domänen von RanBP17 und CRM1

CRM1 vermittelt über die Bindung an RanGTP den Transport einer Vielzahl von Substraten mit NES-Domäne („nuclear export signal“) aus dem Kern in das Cytoplasma (Fornerod et al 1997a). Durch den Export von Proteinen wie CyclinB, HOG1 MAPK (Ferrigno et al., 1998), MAPKAP Kinase 2 (Engel et al., 1998), NFAT (Kehlenbach et al., 1998) oder AP-1 (Kuge et al., 1998; Yan et al., 1998), übt CRM1 eine bedeutende Funktion im Zellzyklus aus.

4. Diskussion

An der von unserer Arbeitsgruppe beschriebenen t(5;14)(q34;q11) bei Patienten mit B- und T-Zell ALL sind der TCR δ auf Chromosom 14 und ein bis dahin unbekanntes Gen auf Chromosom 5q34 beteiligt (Whitlock et al., 1994). In der vorliegenden Arbeit wird die Klonierung und Charakterisierung des wahrscheinlich involvierten Gens von Chromosom 5 sowie seine Lage zu den Bruchpunkten bei zwei ALL-Patienten analysiert. Dieses Gen, *ranBP17* genannt, kodiert für einen Kerntransportrezeptor.

4.1 Alternative Spleißformen des *ranBP17*-Gens

Die mittels Exon-Trapping und EST-Analyse zusammengesetzte cDNA-Sequenz stellte den Ausgangspunkt zur Klonierung des in Bruchpunktnähe gelegenen Gens dar. Die Klonierung eines 4.4kb großen Transkriptes erfolgte durch Screening von cDNA-Bibliotheken und 5'-RACE-PCR. Die Vollständigkeit dieses Transkriptes belegen der Translationsstart in einer typischen Kozak-Konsensussequenz (Kozak, 1987), die Polyadenylierungsstelle mit dem anschließenden polyA-Schwanz und die Übereinstimmung mit dem Hybridisierungsmuster der Northern Blot Analyse. Ein internes Polyadenylierungssignal führt zu Bildung eines kürzeren, 3.6kb großen Transkriptes von dem die Synthese des 1088AA großen Proteins unbeeinflusst ist.

Multiple Signale im Northern Blot und alternative 3'-Enden deuten auf alternative Spleißprozesse hin. Die Klonierungsergebnisse bestätigten diese Vermutung und ergaben eine unterschiedliche Einbeziehung der Exone 9, 14b-e, 24b sowie 25. Das alternative Spleißen kann die Kodierungskapazität eines Gens durch Hinzufügen oder Weglassen von Exonen um ein Vielfaches erhöhen. Die aus alternativ gespleißten mRNAs resultierenden Proteine besitzen häufig eine ähnliche, seltener eine völlig neue Funktion. Alternatives Spleißen ist auf verschiedene Regulationsmechanismen zurückzuführen. So kann durch verschiedene Faktoren die komplementäre Basenpaarung zwischen dem snRNP/U1-Komplex, einem für das Spleißen der prä-mRNA essentiellen RNA-Proteinkomplex, an den 5'-Spleißstellen im Intron beeinflusst werden. Außerdem kann durch Bindung von SR-Proteinen, einer großen Familie mit alternierenden Arginindomänen, an den snRNP/U1-Komplex weniger favorisierte Exone gespleißt werden. Die Blockierung von Spleißstellen durch Liganden stellt einen dritten Mechanismus alternativer Spleißprodukte dar. So bestimmt beispielsweise das *tra*-Gen

bei *D. melanogaster* durch Blockierung einer Spleißstelle mittels des SXL-Proteins das Geschlecht (McKeown, 1992). Interessant ist das Auftreten von alternativ gespleißten Transkripten des *ranBP17*-Gens durch verschiedene Kombinationen der Exone 14b-e. Die Exone 14b und 14c führen ein Stop-Codon ein und verkürzen dadurch den ORF. Bemerkenswert ist auch das Variationsspektrum von Spleißvarianten mit den Exonen 14b-e in der Clontech-Bibliothek („Large Insert“-cDNA) im Gegensatz zu nur einer Spleißvariante (Exon 14c) in der zuvor analysierten GIBCO/Life Technologies cDNA-Bibliothek. Einen Hinweis zur Aufklärung dieser Sequenzvariationen kann ein Blick auf den Ursprung dieser Bibliotheken geben. So wurde die cDNA der GIBCO-Bibliothek aus der RNA einer 60jährigen Person synthetisiert, wohingegen die cDNA der Clontech-Bibliothek aus einem RNA-Pool von 24 Personen im Alter von 25-64 Jahren gebildet wurde. Eine altersbedingte Bevorzugung bestimmter Spleißvarianten von *ranBP17* könnte die Ursache der verschiedenen Spleißvarianten in der Clontech-Bibliothek sein.

Die identifizierten Spleißvarianten mit den Exonen 14b-e, die eine deutliche Verkürzung des jeweiligen Proteins zur Folge haben, deuten auf eine regulatorische Funktion hin. So konnten für den Transkriptionsfaktor CREB (cAMP response element binding protein; Habener et al., 1995) zwei verkürzte Isoformen identifiziert werden, die ausschließlich in Testisgewebe gefunden wurden (Daniel and Habener, 1998). Die zwei verkürzten Isoformen kommen durch das alternative Spleißen mit den Exonen W und Y zustande, die jeweils ein Stopcodon in den ORF einführen. Die beiden sogenannten Repressor-CREB Isoformen inhibieren in den Keimzellen die Funktion des Transkriptionsfaktors CREB.

RanBP17 könnte mit den Exonen 14b und 14c einem ähnlichen Mechanismus unterliegen und seine Funktion in der Zelle selbst regulieren.

4.2 t(5;14) bei ALL und Deregulation der biologischen Funktion des RanBP17-Proteins

Da die Genbanksuche mittels der klonierten cDNA eine signifikante Homologie zu dem humanen Ran-bindenden Protein 16 (Acc. No. AF064729) aufdeckte, wurde das auf Chromosom 5q34 gelegene Gen *ranBP17* genannt (Kutay et al., 2000). Die mittels Computeranalyse ermittelte N-terminale Ran-Bindungsdomäne unterstreicht seine Funktion in nukleären Transportprozessen.

RAN ist eine mit RAS-verwandte GTPase, die in einer GDP- und einer GTP-gebundenen Form variiert (Bischoff and Ponstingl, 1991b). Die Beobachtung, daß RAN an nukleären Transportprozessen beteiligt ist, führte zu der Entdeckung der Ran-bindenden Proteine (RanBP). Diese sind nach Bindung an RAN über eine N-terminale Domäne für den Import und Export zahlreicher C-terminal gebundener Substrate verantwortlich (Chi et al., 1996; Arts et al., 1998). Von den Proteinen CAN und NUP98, die Bestandteil des Kernporenkomplexes sind und an nukleären Transportprozessen beteiligt sind, konnte eine Beteiligung bei der Entstehung von Leukämie nach chromosomalen Translokationen gezeigt werden. Das Onkogen *can/nup214* (nucleoporin214) wird im Rahmen der t(6;9)(p23;q34) durch die Gene *dek* oder *set* fehlreguliert (van Lindern et al., 1992). Fusionen, des auf Chromosom 11p15 gelegenen Nucleoporins NUP98 mit HOXA9, HOXD13, DDX10 und PMX1 sind bei ALL- oder AML-Patienten mit den Translokationen t(7;11)(p15;p15), t(2;11)(q35;p15), inv(11)(p15;q22) und t(1;11)(q23;p15) nachgewiesen worden (Borrow et al., 1996; Hussey et al., 1999).

Die im RanBP17-Protein identifizierte Importinβ-Domäne sowie die N-Glykosylierungsstellen, PKC-/CKII-Phosphorylierungsstellen und N-Myristolierungsstellen werden in ähnlicher Anzahl und Verteilung in dem exportierenden Kerntransportrezeptorprotein CRM1 (Fornerod et al., 1997b) gefunden. In der Familie der Importinβ-Kerntransportrezeptoren zeigt RanBP17 damit die höchste Homologie zu CRM1 und könnte somit ebenfalls für den Export von Substraten verantwortlich sein.

Die N-Glykosylierungsstellen und N-Myristolierungsstellen von RanBP17 und CRM1 weisen auf die Assoziation beider Proteine mit Kompartimentmembranen hin. Dabei wirkt sich die Glykosylierung eines Proteins auf seine Ausrichtung innerhalb einer Membran aus. Die hydrophilen Zuckerreste lassen das Protein an diesen Stellen auf der Membranaußenseite, der wässrigen Phase erscheinen. Die über das Enzym N-Myristoyl-Transferase (NMT) angekoppelte Fettsäure Myristat (Towler et al., 1987) findet sich bei membranständigen und cytosolischen Proteinen wieder. Beide Modifizierungsstellen stehen in Einklang mit dem cytosolischen sowie dem membranständigen Charakter von nukleären Transportrezeptoren.

Eine Funktion von PKC-Phosphorylierungsstellen liegt in der Degradierung bzw. in der Konformationsänderung von NLS/NES-Inhibitoren. Inhibitoren maskieren die NLS/NES-Domäne von Proteinsubstraten und verhindern somit deren Transport in bzw. aus dem Kern. Im Gegensatz dazu können phosphorylierte Substrate durch Bindung an einen Kerntransportrezeptor transportiert werden. So konnte für den Transkriptionsfaktor NF-κB

(Schmitz and Baeuerle, 1991; Lenardo and Baltimore, 1989) die Demaskierung des an die NLS-Domäne-bindenden inhibitorischen Faktors I κ B über Phosphorylierung durch die PKC gezeigt werden (Diaz-Meco et al., 1994). Die Rolle von PKC-Phosphorylierungsstellen für Kerntransportrezeptoren konnte zwar bisher noch nicht belegt werden, stünden aber in Einklang mit einer Regulation dieser Proteine über inhibitorische Faktoren.

Die Bindung eines Kerntransportrezeptors wie RanBP17 an den NPC, an seine Substrate und Transport-vermittelnde Adapterproteine, könnte durch Inhibitoren an den PKC-Phosphorylierungsstellen wesentlich beeinflusst werden. Ein verkürztes RanBP17-Protein infolge der t(5;14), dem die Substratbindungsstelle fehlt, könnte einen wesentlichen Einfluß auf nukleäre Transportprozesse ausüben. So würde ein erhöht exprimiertes RanBP17 zuviel Substrat transportieren und damit zelluläre Prozesse, die diese Substrate vermitteln, wesentlich beeinflussen.

Ein Beispiel für einen solchen Pathomechanismus liefert NOTCH1. Das eine NLS-Domäne tragende NOTCH1 (Artavanis-Tsakonas et al., 1995; del Amo et al., 1993; Gallahan and Callahan, 1997), führt infolge einer t(7;9) zur ALL-Entstehung (Ellisen et al., 1991). Das Fehlen der im C-terminalen Bereich von NOTCH1 lokalisierten CKII- und PKC-Phosphorylierungsstellen resultiert in einem bevorzugten Transport von NOTCH1 in den Kern. Dort führt es über weitere Protein-Protein-Interaktionen u.a. mit dem Transkriptionsfaktor HES-1 (Jarriault et al., 1995; Tamura et al., 1995; Kopan et al., 1994) zur Zelltransformation.

Die fehlende Passage des verkürzten RanBP17 könnte somit dessen Lokalisation auf einer der beiden Kompartimentseiten favorisieren und dort erhöht auftreten lassen. Aufgrund der erhöhten RanBP17 Menge würde dann eine Wechselwirkung mit Proteinen anderer Signalwege und Regelmechanismen, Einfluss auf die Zelldifferenzierung nehmen.

4.3 Rolle des TCR δ -Enhancers bei der t(5;14)

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Bruchpunkt der t(5;14) in der kodierenden Region, ein zweiter in unmittelbarer 3'-Nähe von *ranBP17* ermittelt werden. In beiden Fällen wird das TCR δ -Gen und sein Enhancer in die Nähe zu *ranBP17* transloziert. Die Untersuchungen der Patientenbruchpunkte führte außerdem zu der Identifizierung des 3' von *ranBP17* gelegenen Homeoboxgens *hox11l2* (Delgado et al. 1998) auf Chromosom 5q34. Dieses wird infolge der reziproken t(5;14) zum Chromosom 14q11 transloziert. Homeoboxgene bilden eine

evolutionär stark konservierte Familie von Transkriptionsfaktoren, deren Beteiligung an der humanen und murinen Leukämogenese vielfach beschrieben worden ist (Borrow et al., 1996; Nakamura et al., 1996). So konnte beispielsweise die Deregulation von *hox11* an der t(10;14)(q24;q11) und der t(7;10)(q35;q24) bei Patienten mit T-ALL gezeigt werden (Lu et al., 1991; Hatano et al., 1991; Kennedy et al., 1991; Dúbe et al., 1991).

Die wichtige Frage war welches der beiden Gene, *ranBP17* oder *hox11l2*, ursächlich für die Leukämieentstehung bei t(5;14) positiven ALL-Patienten ist. Northern Blot Experimente sollten Aufschluß darüber geben. Da von den Patienten 1 und 2 kein Zellmaterial mehr vorhanden war, wurde ein dritter t(5;14) ALL-Patient mittels Northern Blot untersucht. Die Hybridisierung mit einer *hox11l2*-Sonde zeigte bei dem Patienten 3 keine Signale. Dieser Befund spricht gegen eine Beteiligung dieses Gens an der Leukämogenese bei t(5;14) ALL-Patienten. Im Gegensatz dazu konnten bei der *ranBP17*-Hybridisierung Signale identifiziert werden. Aufgrund der geringen und schlechten mRNA-Qualität konnte allerdings keine eindeutige Aussage zum Muster und zur Stärke der *ranBP17*-Expression gemacht werden. Die Möglichkeit, daß das erhebliche Hintergrundsignal ein abweichendes oder erhöhtes Transkriptmuster überdeckt, ist gegeben. Ferner kann die Expression des von der Translokation betroffenen *ranBP17*-Allels durch das Wildtyp-Allel überdeckt werden. Die Translokation der Enhancer von TCR $\alpha\delta$ an das funktionstüchtige *ranBP17* weisen, in Analogie mit vielen anderen Fällen bei denen ein TCR- oder Ig-Enhancer ein anderes Gen aktiviert, auf die Beteiligung von *ranBP17* an der Leukämieentstehung hin (Abb.33). Der TCR $\alpha\delta$ -Lokus beinhaltet mit den Promotoren der beiden V-Regionen, den beiden Enhancer-Elemente α/δ , Silencer-Elementen und dem TEA-Promotor der J α -Region, regulatorische Elemente der Genexpression. Enhancer-Elemente sind dabei in der Lage unabhängig von ihrer Orientierung, die von den orientierungsabhängigen Promotoren initiierte Transkription, um ein Vielfaches zu erhöhen (Dillon et al., 1993).

Ein weiterer Beleg für ein fehlreguliertes *ranBP17* könnte die identifizierte Expression in der Zelllinie Nalm-6 sein. Diese Zelllinie wurde von Leukämiezellen eines Patienten mit prä-B-ALL (Minowada et al., 1978; Hurwitz et al., 1979) abgeleitet und zeigt eine t(5;12)(q33.2;p13.2). Durch FISH-Analysen konnte gezeigt werden, daß weder der Transkriptionsfaktor ETV6/TEL (Baens et al., 1996) auf Chromosom 12, noch die β -Untereinheit des PDGF-Rezeptors auf Chromosom 5q33 (Golub et al., 1994) an der Pathogenese beteiligt sein können (Wlodarska et al., 1997). Die beteiligten Gene und die Auswirkungen dieser Translokation

konnten bisher nicht aufgeklärt werden. Die Möglichkeit einer Beteiligung des *ranBP17*-Gens an der Chromosomenaberration in Nalm-6 erscheint durchaus gegeben.

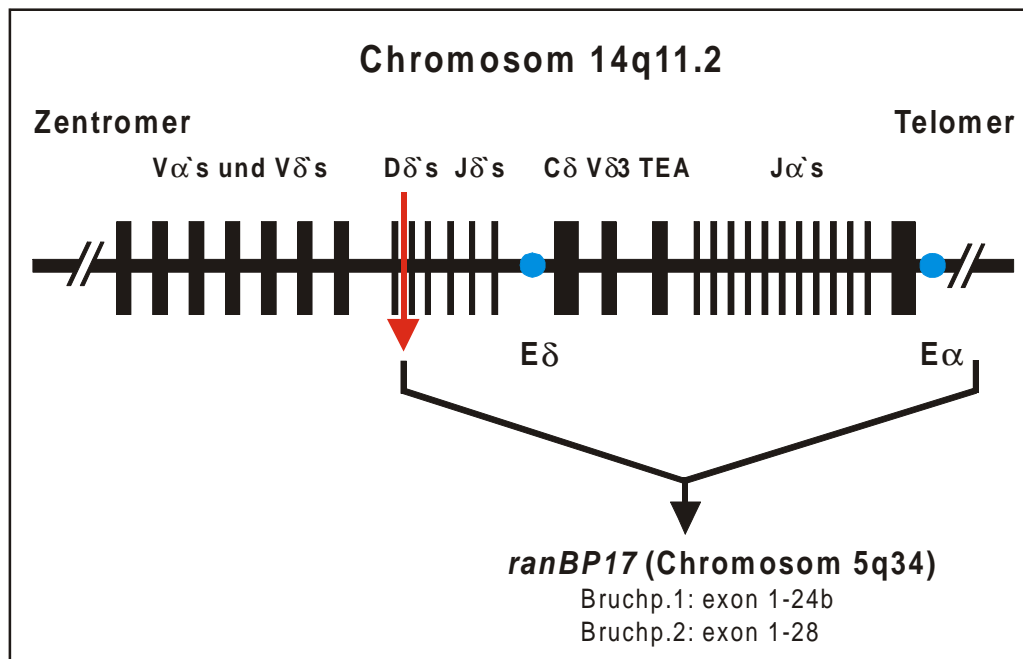


Abbildung 33: Translokation des telomeren Anteils von Chromosom 14q11 mit den Enhancern des TCR α und TCR δ an Chromosom 5q34 (E = Enhancer, TEA = T-early- α).

4.4 Evolutionäre Konservierung

Hybridisierungen von genomischen Southern Blots verschiedener Spezies, sogenannten Zoo Blots, lassen Rückschlüsse auf die Konservierung eines Gens in der Evolution zu.

Auf diese Weise konnten wir die Konservierung des *ranBP17*-Gens vom Menschen bis zum Huhn nachweisen. Ein weiterer Hinweis auf die hohe evolutionäre Konservierung von *ranBP17* ist die 41%ige Homologie von *ranBP17* zu dem *C. elegans* Gen *c35a5.8*. Das ähnliche Expressionsmuster in der Maus sowie der fast identische offene Leserahmen in dieser Spezies unterstreicht die hohe Konservierung von *ranBP17*. Die evolutionäre Konservierung des *ranBP17*-Gens weist auf dessen essentielle Bedeutung im nukleären Kerntransport hin.

4.5. Ausblick

Die Lokalisation von *ranBP17* in unmittelbarer Nähe der Bruchpunkte bei zwei ALL-Patienten mit einer t(5;14) Translokation, läßt auf eine Fehlregulation von *ranBP17* als onkogen wirkendes Kandidaten-Gen schließen. Für den Nachweis einer Fehlregulation könnten Northern Blot Analysen von weiteren Patienten Aufschluß geben.

Eine andere Technik stellt die Western Blot Analyse mit, aus t(5;14) positiven Patienten, isoliertem Protein dar. Die Tatsache, daß die Proteinmenge auch von der Stabilität der mRNA eines Gens abhängt, läßt die Western Blot Analyse als guten Nachweis einer fehlregulierten Translation zu.

Neben diesen Nachweismethoden ist die Klonierung weiterer Bruchpunkte von ALL-Patienten mit einer t(5;14)(q34;q11) für die Klärung der Rolle des *ranBP17*-Gens in der Leukämogenese relevant.

Andere Analysen sollten das Wildtyp-*ranBP17* Gen und seine Funktion untersuchen. Das zur Importin β -Superfamilie gehörige RanBP17 übt wahrscheinlich, aufgrund seiner Homologie zu CRM1, eine Funktion als exportierender Kerntransportrezeptor aus. Interessant wäre neben dem Nachweis von RanBP17 als Exportin auch die Charakterisierung der von RanBP17 transportierten Substrate. Die Identifizierung dieser Substrate und ihrer Bindungsstellen durch z.B. das Two-Hybrid-Verfahren und Proteinbindungsstudien, ließe Rückschlüsse auf die Bedeutung von RanBP17 in der Zelle und damit eventuell auf die Bedeutung eines fehlregulierten *ranBP17*-Gens zu. Ferner könnte man mittels Knock-out bzw. Knock-in Mäusen die Bedeutung von RanBP17 für den gesamten Organismus ermitteln. Das ausgeschaltete Gen bei dem Knock-out Modell könnte klären helfen, ob die Expression von *ranBP17* in Testis tatsächlich essentiell für dieses Gewebe ist, da während der Spermatogenese viele Gene angeschaltet werden (Eddy and O'Brien, 1998). Transgene und anschließende Knock-in Mäuse, bei denen man das *ranBP17*-Gen gewebsspezifisch exprimiert, könnten dagegen die Funktion von RanBP17 bei der Leukämogenese näher beleuchten.

5. Zusammenfassung

Die Lokalisation von *ranBP17* im Bruchpunktbereich t(5;14)(q34;q11) bei zwei ALL-Patienten wurde mittels genomischer Sequenzierung isolierter, *ranBP17*-positiver PAC-Klone und genomischer BLAST-Homologiesuche ermittelt. Dabei bricht *ranBP17* beim ersten Patienten zwischen den Exonen 24a-25 auseinander, wohingegen bei dem Patienten 2 der Bruch 8030bp hinter dem 3'-Ende dieses Gens stattfindet und *ranBP17* komplett auf dem Chromosom 5q34 verbleibt. In beiden Fällen werden von Chromosom 14q11 die TCR $\alpha\delta$ -Enhancer in die Nähe von *ranBP17* transloziert. In einer Entfernung von 9242bp vom äußersten 3'-Ende von *ranBP17* konnte durch eine BLAST-Homologiesuche das Exon 1 von *hox11l2*, einem Homeoboxgen, identifiziert werden. Dieses Gen wird durch die t(5;14) bei beiden ALL-Patienten an das TCR-D δ 3-Element von Chromosom 14q11 transloziert. Da bei beiden Bruchpunktereignissen die Enhancer des TCR $\alpha\delta$ -Locus an das funktionstüchtige *ranBP17* transloziert werden, ist von einer Beteiligung dieses Gens an der ALL-Entstehung auszugehen.

Das Expressionsmuster von *ranBP17* in humanem Testis- und Pankreasgewebe zeigte vier Transkripte von 2.0, 4.2, 7.5 und 10.0kb. Die hohe evolutionäre Konservierung von *ranBP17* konnte mittels eines genomischen Southern Blots bis zum Huhn belegt und mittels einer Gendatenbanksuche durch die 41%ige Homologie zum *C. elegans* Gen *c35a5.8* ergänzt werden. Mittels einer 5'-RACE-PCR mit humaner Testis cDNA konnte das Startcodon von *ranBP17*, das in einer typischen Kozak-Konsensussequenz liegt, ermittelt werden. Weitere cDNA-Screeningexperimente führten zur Klonierung mehrerer Transkripte des *ranBP17*-Gens. Das Transkript mit dem längsten ORF besitzt eine Größe von 4301bp und kodiert für ein 1088AA großes Protein. Durch eine genomische BLAST-Homologiesuche konnte die komplette Exonstruktur und der größte Teil der Intronstruktur von *ranBP17* aufgedeckt werden. Neben den 28 Exonen von *ranBP17* konnten dadurch die Exone 9, 14a-e, 24a-b sowie das Exon 25 als Module für alternative Spleißprozesse ermittelt werden, die zu einer Verkürzung des resultierenden Proteins führen.

Die Computer-gestützte Proteinanalyse und die Sequenz-Homologie zu dem Ran-bindenden Protein 16, ordnet RanBP17 in die Proteinfamilie der Importin β Kerntransportrezeptoren ein.

6. Literaturverzeichnis

- Adachi Y., Yanagida M. Higher order chromosome structure is affected by cold-sensitive mutations in a *Schizosaccharomyces pombe* gene *crm1+* which encodes a 115-kD protein preferentially localized in the nucleus and its periphery. *J. Cell Biol.*, **108**, 1195-1207 (1989).
- Adam E.J., Adam S.A. Identification of cytosolic factors required for nuclear location sequence-mediated binding to the nuclear envelope. *J. Cell Biol.*, **125**; 547-555 (1994).
- Adam S.A., Gerace L. Cytosolic proteins that specifically bind nuclear location signals are receptors for nuclear import, *Cell*, **5**, 837-847 (1991).
- Alt F.W., Blackwell T.K., Yancopoulos G.D. Development of the primary antibody repertoire. *Science*, **238**, 1079-1087 (1987).
- Alt F.W., Rathburn G., Oltz E., Taccioli G., Shinaki Y. VDJ recombination. *Immunol. Today*, **8**, 306-314 (1992).
- Alwine J.C., Kemp D.J., Stark G.R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5350-5354 (1977).
- Ames B.N. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science*, **204**, 587-593 (1979).
- del Amo F.F., Gendron-Maguire M., Swiatek P.J., Jenkins N.A., Copeland N.G., Gridley T. Cloning, analysis, and chromosomal localization of Notch-1, a mouse homolog of *Drosophila* Notch. *Genomics*, **15**, 259-264 (1993).
- Artavanis-Tsakonas S., Matsuno K., Fortini M.E. Notch signaling. *Science*, **268**, 225-232 (1995).
- Arts G.J., Fornerod M., Mattaj I.W. Identification of a nuclear export receptor for tRNA. *Curr. Biol.*, **8**, 305-314 (1998).
- Asou N., Hattori T., Matsuoka M., Kawano F., Takatsuki K. Rearrangements of T-cell antigen receptor delta chain gene in hematologic neoplasms. *Blood*, **74**, 2707-2721 (1989).
- Baens M., Peeters P., Guo C., Aerssens J., Marynen P. Genomic organization of TEL: the human ETS-variant gene 6. *Genome Res.*, **6**, 404-413 (1996).
- Barbacid M. Ras genes. *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 779-827 (1987).
- Beddow A.L., Richards S.A., Orem N.R., Macara I.G. The Ran/TC4 GTPase-binding domain: identification by expression cloning and characterization of a conserved sequence motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 3328-3332 (1995).

- Belhumeur P., Lee A., Tam R., DiPaolo T., Fortin N. GSP1 and GSP2, genetic suppressors of the prp20-1 mutant in *Saccharomyces cerevisiae*: GTP-binding proteins involved in the maintenance of nuclear organization. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 2152-2161 (1993).
- Bird A. The essentials of DNA methylation. *Cell*, **70**, 5-8 (1992).
- Bischoff F.R., Ponstingl H. Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by mitotic regulator RCC1. *Nature*, **354**, 80-82 (1991).
- Bischoff F.R., Ponstingl H. Mitotic regulator protein RCC1 is complexed with a nuclear ras-related polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 10830-10834 (1991).
- Bischoff F.R., Klebe C., Kretschmer J., Wittinghofer A. RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear Ras-related Ran. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 2587-2591 (1994).
- Bischoff F.R., Krebber H., Kempf T., Hermes I., Ponstingl H. Human RanGTPase-activating protein RanGAP1 is a homologue of yeast Rna1p involved in mRNA processing and transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1749-1753 (1995).
- Bonner J. Some progress in our understanding of chromatin organization. *Monograph*, **28**, 53-64 (1978).
- Borrow J., Shearman A.M., Stanton V.P.Jr., Becher R., Collins T., Williams A.J., Dube I., Katz F., Kwong Y.L., Morris C., Ohyashiki K., Toyama K., Rowley J., Housman D.E. The t(7;11)(p15;p15) translocation in acute myeloid leukemia fuses the genes for nucleoporin NUP98 and class I homeoprotein HOXA9. *Nat. Genet.*, **12**, 159-167 (1996).
- Boulton J., Fidler C., Lewis S., Kelly H., Sheridan H., Littlewood T.J., Buckle V.J., Wainscoat J.S. Molecular mapping of uncharacteristically small 5q deletions in two patients with the 5q-syndrome: delineation of the critical region on 5q and identification of a 5q-breakpoint. *Genomics*, **19**, 425-432 (1994).
- Breathnach R., Chambon P. Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 349-383 (1981).
- Burnette W.N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.*, **112**, 195-203 (1981).
- Capobianco A.J., Zagouras P., Blaumueller C.M., Artavanis-Tsakonas S., Bishop J.M. Neoplastic transformation by truncated alleles of human NOTCH1/TAN1 and NOTCH2. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 6265-6273 (1997).
- Chi N.C., Adam E.J., Adam S.A. Sequence and characterization of cytoplasmic nuclear protein import factor p97. *J. Cell. Biol.*, **130**, 265-274 (1995).
- Chi N.C., Adam E.J., Visser G.D., Adam S.A. RanBP1 stabilizes the interaction of Ran with p97 nuclear protein import. *J. Cell. Biol.*, **135**, 559-569 (1996).

- Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159 (1987).
- Chung C.T., Niemela S.L., Miller R.H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **86**, 2172-2175 (1989).
- Cleaver J.E. Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature*, **218**, 652-656 (1968).
- Cooper C.S., Blair D.G., Tainsky M.A., Huebner K., Croce C.M., Vande Woude G.F. Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature*, **311**, 29-33 (1984).
- Corbett A.H., Silver P.A. The NTF2 gene encodes an essential, highly conserved protein that functions in nuclear transport in vivo. *J. Biol. Chem.*, **271**, 18477-18484 (1996).
- Coutavas E., Ren M., Oppenheim J. D., D'Eustachio P., Rush M.G. Characterization of proteins that interact with the cell-cycle regulatory protein Ran/TC4. *Nature*, **366**, 585-587 (1993).
- Daniel P.B., Habener J.F. Cyclic alternative exon splicing of transcription factor cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein (CREB) messenger ribonucleic acid during rat spermatogenesis. *Endocrinology*, **139**, 3721-3729 (1998).
- Dasso M. RCC1 in the cell cycle: the regulator of chromosome condensation takes on new roles. *Trends Biochem. Sci.*, **18**, 96-101 (1993).
- Dear T.N., Sanchez-Garcia I., Rabbitts T.H. The HOX11 gene encodes a DNA-binding nuclear transcription factor belonging to a distinct family of homeobox genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 4431-4435 (1993).
- Dear T.N., Colledge W.H., Carlton M.B., Lavenir I., Larson T., Smith A.J., Warren A.J., Evans M.J., Sofroniew M.V., Rabbitts T.H. The HOX11 gene is essential for cell survival during spleen development. *Development*, **121**, 2909-2915 (1995).
- Denhardt D.T. A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **23**, 641-646 (1966).
- Diaz-Meco M.T., Lozano J., Municio M.M., Berra E., Frutos S., Sanz L., Moscat J. Evidence for the in vitro and in vivo interaction of Ras with protein kinase C zeta. *J. Biol. Chem.*, **269**, 31706-31710 (1994).
- Dillon N., Grosveld F. Transcriptional regulation of multigene loci: multilevel control. *Trends Genet.*, **9**, 134-137 (1993).
- Dingwall C., Laskey R.A. Nuclear targeting sequences-a consensus? *Trends Biochem. Sci.*, **16**, 478-481 (1991).

- Drivas G.T., Shih A., Coutavas E., Rush M.G., D'Eustachio P. Characterization of four novel ras-like genes expressed in a human teratocarcinoma cell line. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 1793-1798 (1990).
- Eddy E.M., O'Brien D.A. Gene expression during mammalian meiosis. *Curr. Top Dev. Biol.*, **37**, 141-200 (1998).
- Engel K., Kotlyarov A., Gaestel M. Leptomycin B-sensitive nuclear export of MAPKAP kinase 2 is regulated by phosphorylation. *EMBO J.*, **17**, 3363-3371 (1998).
- Engler P., Weng A., Storb U. Influence of CpG methylation and target spacing on V(D)J recombination in atransgenic substrate. *Mol. Cell. Bio.*, **13**, 571-577 (1993).
- Erikson J., Finger L., Sun L., ar-Rushdi A., Nishikura K., Minowada J., Finan J., Emanuel B.S., Nowell P.C., Croce C.M. Deregulation of c-myc by translocation of the alpha-locus of the T-cell receptor in T-cell leukemias. *Science*, **232**, 884-886 (1986).
- Fakharzadeh S.S., Trusko S.P., George D.L. Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *EMBO J.*, **10**, 1565-1569 (1991).
- Fasano O., Birnbaum D., Edlund L., Fogh J., Wigler M. New human transforming genes detected by a tumorigenicity assay. *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 1695-1705 (1984).
- Fedorcsak I., Natarajan A.T., Ehrenberg L. On the extraction of ribonucleic acid with template activity from barley embryos using diethyl pyrocarbonate as nuclease inhibitor. *Eur. J. Biochem.*, **10**, 450-8 (1969).
- Felix C.A., Poplack D.G., Reaman G.H., Steinberg S.M., Cole D.E., Taylor B.J., Begley C.G., Kirsch I.R. Characterization of immunoglobulin and T-cell receptor gene patterns in precursor acute lymphoblastic leukemia of childhood. *J. Clin. Oncol.*, **8**, 431-442 (1990).
- Ferrigno P., Posas F., Koepp D., Saito H., Silver P.A. Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. *EMBO J.*, **17**, 5606-5014 (1998).
- Fornerod M., van Deursen J., van Baal S., Reynolds A., Davis D., Murti K.G., Franssen J., Grosveld G. The human homologue of yeast CRM1 is in a dynamic subcomplex with CAN/Nup214 and a novel nuclear pore component Nup88. *EMBO J.*, **16**, 807-816 (1997).
- Fornerod M., Ohno M., Yoshida M., Mattaj I.W. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell*, **90**, 1051-1060 (1997).
- Gallahan D., Callahan R. The mouse mammary tumor associated gene INT3 is a unique member of the NOTCH gene family (NOTCH4). *Oncogene*, **14**, 1883-1890 (1997).
- Gehring W.J., Affolter M., Burglin T. Homeodomain proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 487-526 (1994).

- Gehring W.J., Qian Y.Q., Billeter M., Furukubo-Tokunaga K., Schier A.F., Resendez-Perez D., Affolter M., Otting G., Wuthrich K. Homeodomain-DNA recognition. *Cell*, **78**, 211-223 (1994).
- Gillespie D., Spiegelman S. A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane. *J. Mol. Biol.*, **12**, 829-842 (1965).
- Golub T.R., Barker G.F., Lovett M., Gilliland D.G. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell*, **77**, 307-316 (1994).
- Goodhardt M., Cavelier P., Doyen N., Kallenbach S., Babinet C., Rougeon F. Methylation status of immunoglobulin kappa gene segments correlates with their recombination potential. *Eur. J. Immunol.*, **23**, 1789-1795 (1993).
- Görlich D., Prehn S., Laskey R.A., Hartmann E. Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell*, **79**, 767-778 (1994).
- Görlich D., Vogel F., Mills AD, Hartmann E, Laskey RA. Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. *Nature*, **377**, 246-248 (1995).
- Görlich D., Mattaj I.W. Nucleocytoplasmic transport. *Science*, **27**, 1513-1518 (1996).
- Görlich D., Pante N., Kutay U., Aebi U., Bischoff F.R. Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO J.*, **15**, 5584-5594 (1996).
- Görlich D., Dabrowski M., Bischoff F.R., Kutay U., Bork P., Hartmann E., Prehn S., Izaurralde E. A novel class of RanGTP binding proteins. *J. Cell Biol.*, **138**, 65-80 (1997).
- Habener J.F., Miller C.P., Vallejo M. Cyclic AMP-dependent regulation of gene transcription by cAMP response element-binding protein and cAMP response modulator. *Vitam. Horm.*, **51**, 1-57 (1995).
- Hansen-Hagge T.E., Janssen J.W., Hameister H., Papa F.R., Zechner U., Seriu T., Jauch A., Becke D., Hochstrasser M., Bartram C.R. An evolutionarily conserved gene on human chromosome 5q33-q34, UBH1, encodes a novel deubiquitinating enzyme. *Genomics*, **49**, 411-418 (1998).
- Hatano M., Roberts C.W., Minden M., Crist W.M., Korsmeyer S.J. Deregulation of a homeobox gene, HOX11, by the t(10;14) in T cell leukemia. *Science*, **253**, 79-82 (1991).
- Hayashi S., Scott M.P. What determines the specificity of action of Drosophila homeodomain proteins? *Cell*, **63**, 883-894 (1990).
- Hermeking H., Lengauer C., Polyak K., He T.C., Zhang L., Thiagalingam S., Kinzler K.W., Vogelstein B. 14-3-3s is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol. Cell.*, **1**, 3-11, (1997).

- Hiom K., Gellert M. A stable RAG1-RAG2-DNA complex that is active in V(D)J cleavage. *Cell*, **88**, 65-72 (1997).
- Hurwitz R., Hozier J., LeBien T., Minowada J., Gajl-Peczalska K., Kubonishi I., Kersey J. Characterization of a leukemic cell line of the pre-B phenotype. *Int. J. Cancer*, **23**, 174-180 (1979).
- Hussey D.J., Nicola M., Moore S., Peters G.B., Dobrovic A. The t(4;11)(q21;p15) translocation fuses the *NUP98* and *RAP1GADS1* genes and is recurrent in T-cell acute lymphocytic leukemia. *Blood*, **94**, 2072-2079 (1999).
- Imamoto N., Shimamoto T., Takao T., Tachibana T., Kose S., Matsubae M., Sekimoto T., Shimonishi Y., Yoneda Y. In vivo evidence for involvement of a58kDa component of nuclear pore-targeting complex in nuclear protein import. *EMBO J.*, **14**, 3617-3626 (1995).
- Izaurrealde E., Kutay U., von Kobbe C., Mattaj I.W., Görlich D. The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *EMBO J.*, **16**, 6535-6547 (1997).
- Janssen J.W., Vaandrager J.W., Heuser T., Jauch A., Kluin P.M., Geelen E., Bergsagel P.L., Kuehl W.M., Drexler H.G., Otsuki T., Bartram C.R., Schuurin E. Concurrent activation of a novel putative transforming gene, *myeov*, and cyclin D1 in a subset of multiple myeloma cell lines with t(11;14)(q13;q32). *Blood*, **95**, 2691-2698 (2000).
- Jaju R.J., Boulton J., Oliver F.J., Kostrzewa M., Fidler C., Parker N., McPherson J.D., Morris S.W., Muller U., Wainscoat J.S., Kearney L. Molecular cytogenetic delineation of the critical deleted region in the 5q- syndrome. *Genes Chromosomes Cancer*, **22**, 251-26 (1998).
- Jans D.A. Nuclear signaling pathways for polypeptide ligands and their membrane receptors. *FASEB J.*, **8**, 841-847 (1994).
- Jarriault S., Brou C., Logeat F., Schroeter E.H., Kopan R., Israel A. Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature*, **377**, 355-358 (1995).
- Kaffman A., Rank N.M., O'Shea E.K. Phosphorylation regulates association of the transcription factor Pho4 with its import receptor Pse1/Kap121. *Genes Dev.*, **12**, 2673-2683 (1998).
- Kagan J., Finger L.R., Letofsky J., Finan J., Nowell P.C., Croce C.M. Clustering of breakpoints on chromosome 10 in acute T-cell leukemias with the t(10;14) chromosome translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 4161-4165 (1989).
- Kagan J., Joe Y.S., Freireich E.J. Joining of recombination signals on the der 14q-chromosome T-cell acute leukemia with t(10;14) chromosome translocation. *Cancer Res.*, **54**, 226-230 (1994).
- Kalderon D., Roberts B.L., Richardson W.D., Smith A.E. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, **39**, 499-509 (1984).

- Kehlenbach R.H., Dickmanns A., Gerace L. Nucleocytoplasmic shuttling factors including Ran and CRM1 mediate nuclear export of NFAT In vitro. *J. Cell Biol.*, **141**, 863-874 (1998).
- Kennedy M.A., Gonzalez-Sarmiento R., Kees U.R., Lampert F., Dear N., Boehm T., Rabbitts T.H. HOX11, a homeobox-containing T-cell oncogene on human chromosome 10q24. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 8900-8904 (1991).
- Khandjian E.W. UV crosslinking of RNA to nylon membrane enhances hybridization signals. *Mol. Biol. Rep.*, **11**, 107-115 (1986).
- Kingzette M., Spieker-Polet H., Yam P.C., Zhai S.K., Knight K.L. Trans-chromosomal recombination within the Ig heavy chain switch region in B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 11840-11845 (1998).
- Koch P., Bohlmann I., Schäfer M., Hansen-Hagge T.E., Kiyoi H., Wilda M., Hameister H., Bartram C.R., Janssen J.W.G. Identification of a novel putative Ran-binding-protein and its close homologue. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **278**, 241-249 (2000).
- Kohl N.E., Gee C.E., Alt F.W. Activated expression of the N-myc gene in human neuroblastomas and related tumors. *Science*, **226**, 1335-1337 (1984).
- Kohl N.E., Kanda N., Schreck R.R., Bruns G., Latt S.A., Gilbert F., Alt F.W. Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. *Cell*, **35**, 359-367 (1983).
- Kongsuwan K., Webb E., Housiaux P., Adams J.M. Expression of multiple homeobox genes within diverse mammalian hematopoietic lineages. *EMBO J.*, **7**, 2131-2138 (1988).
- Kopan R., Nye J.S., Weintraub H. The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD. *Development*, **120**, 2385-2396 (1994).
- Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 8125-8148 (1987).
- Kramer A. The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 367-409 (1996).
- Kuge S., Toda T., Iizuka N., Nomoto A. Crml (XpoI) dependent nuclear export of the budding yeast transcription factor yAP-1 is sensitive to oxidative stress. *Genes Cells*, **3**, 521-532 (1998).
- Kulozik A.E., Hentze M.W., Hagemeyer C., Bartram C.R. Molekulare Medizin. Grundlagen, Pathomechanismen, Klinik. Copyright © 2001 by Walter de Gruyter GmbH & Co. KG
- Kurzrock R., Gutterman J.U., Talpaz M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N. Engl. J. Med.*, **319**, 990-998 (1988).

- Kutay U., Izaurralde E., Bischoff F.R., Mattaj J.W., Görlich D. Dominant-negative mutants of importin- β block multiple pathways of import and export through the nuclear pore complex. *EMBO J.*, **16**, 1153-1163 (1997).
- Kutay U., Lipowsky G., Izaurralde E., Bischoff F.R., Schwarzmaier P., Hartmann E., Görlich D. Identification of a tRNA-specific nuclear export receptor. *Mol. Cell.*, **1**, 359-369 (1998).
- Kutay U., Hartmann E., Treichel N., Calado A., Carmo-Fonseca M., Prehn S., Kraft R., Görlich D., Bischoff F.R. Identification of two novel RanGTP-binding proteins belonging to the importin β superfamily. *J. Biol. Chem.*, **275**, 40163-40168 (2000).
- Lawrence H.J., Sauvageau G., Humphries R.K., Largman C. The role of HOX homeobox genes in normal and leukemic hematopoiesis. *Stem Cells*, **14**, 281-291 (1996).
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- Lanford R.E., Butel J.S. Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen. *Cell*, **37**, 801-813 (1984).
- Lange B.J., Raimondi S.C., Heerema N., Nowell P.C., Minowada J., Steinherz P.E., Arenson E.B., O'Connor R., Santoli D. Pediatric leukemia/lymphoma with t(8;14)(q24;q11). *Leukemia*, **6**, 613-618 (1992).
- Laskey R.A., Leno G.H. Assembly of the cell nucleus. *Trends Genet.*, **6**, 406-410 (1990).
- Leder P., Battey J., Lenoir G., Moulding C., Murphy W., Potter H., Stewart T., Taub R. Translocations among antibody genes in human cancer. *Science*, **222**, 765-771 (1983).
- Lehrach H., Diamond D., Wozney J.M., Boedtker H. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry*, **16**, 4743-4751 (1977).
- Lenardo M.J., Baltimore D. NF- κ B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell*, **58**, 227-229 (1989).
- Limpens J., de Jong D., van Krieken J.H., Price C.G., Young B.D., van Ommen G.J., Kluin P.M. Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia. *Oncogene*, **6**, 2271-2276 (1991).
- Lu S., Reyes V.E., Lew R.A., Anderson J., Mole J., Humphreys R.E., Ciardelli T. Role of recurrent hydrophobic residues in catalysis of helix formation by T cell-presented peptides in the presence of lipid vesicles. *J. Immunol.*, **145**, 899-904 (1990).
- Lu S., Reyes V.E., Torgerson R.R., Lew R.A., Humphreys R.E. Common principles in protein folding and antigen presentation. *Trends Biotechnol.*, **9**, 238-242 (1991).

- Lu S., Putney S.D., Robinson H.L. Human immunodeficiency virus type 1 entry into T cells: more-rapid escape from an anti-V3 loop than from an antireceptor antibody. *J. Virol.*, **66**, 2547-2550 (1992).
- Manak J.R., Scott M.P. A class act: conservation of homeodomain protein functions. *Dev. Suppl.*, 61-77 (1994).
- McDonell M.W., Simon M.N., Studier F.W. Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J. Mol. Biol.*, **110**, 119-146 (1977).
- McGuire E.A., Hockett R.D., Pollock K.M., Bartholdi M.F., O'Brien S.J., Korsmeyer S.J. The t(11;14)(p15;q11) in a T-cell acute lymphoblastic leukemia cell line activates multiple transcripts, including Ttg-1, a gene encoding a potential zinc finger protein. *Mol. Cell Biol.*, **9**, 2124-2132 (1989).
- McKeithan T.W., Shima E.A., Le Beau M.M., Minowada J., Rowley J.D., Diaz M.O. Molecular cloning of the breakpoint junction of a human chromosomal 8;14 translocation involving the T-cell receptor alpha-chain gene and sequences on the 3' side of MYC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 6636-6640 (1986).
- McKeown M. Alternative mRNA Splicing. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **8**, 133-155 (1992).
- Melchior F., Paschal B., Evans J., Gerace L. Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolyzable analogues of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor. *J. Cell. Biol.*, **123**, 1649-1659 (1993).
- Melo J.V. The molecular biology of chronic myeloid leukaemia. *Leukemia*, **10**, 751-756 (1996).
- Minowada J., Janossy G., Greaves M.F., Tsubota T., Srivastava B.I., Morikawa S., Tatsumi E. Expression of an antigen associated with acute lymphoblastic leukemia in human leukemia-lymphoma cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.*, **60**, 1269-1277 (1978).
- Moore M.S., Blobel G. The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature*, **365**, 661-663 (1993).
- Moore M.S., Blobel G. A G protein involved in nucleocytoplasmic transport: the role of Ran. *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 211-216 (1994).
- Moroianu J., Blobel G. Protein export from the nucleus requires the GTPase Ran and GTP hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4318-4322 (1995).
- Morris S.W., Kirstein M.N., Valentine M.B., Dittmer K.G., Shapiro D.N., Saltman D.L., Look A.T. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*, **263**, 1281-1284 (1994).
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **1**, 263-273 (1986).

- Murray M.J., Shilo B.Z., Shih C., Cowing D., Hsu H.W., Weinberg R.A. Three different human tumor cell lines contain different oncogenes. *Cell*, **25**, 355-361 (1981).
- Nagase,T., Ishikawa,K., Suyama,M., Kikuno,R., Miyajima,N., Tanaka,A., Kotani,H., Nomura,N. and Ohara,O. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XI. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res.*, **5**, 277-286 (1998).
- Nakamura T., Largaespada D.A., Lee M.P., Johnson L.A., Ohyashiki K., Toyama K., Chen S.J., Willman C.L., Chen I.M., Feinberg A.P., Jenkins N.A., Copeland N.G., Shaughnessy J.D. Jr. Fusion of the nucleoporin gene NUP98 to HOXA9 by the chromosome translocation t(7;11)(p15;p15) in human myeloid leukaemia. *Nat. Genet.*, **12**, 154-158 (1996).
- Neumann B., Pospiech A., Schairer H.U. Rapid isolation of genomic DNA from gram-negative bacteria. *Trends Genet.*, **8**, 332-333 (1992).
- Nichols J., Nimer S.D. Transcription factors, translocations, and leukemia. *Blood*, **80**, 2953-2963 (1992).
- Nowell P.C., Hungerford D. A. A new consistent chromosomal abnormality in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, **132**, 1497 (1960).
- Ohtsubo M., Kai R., Furuno N., Sekiguchi T., Sekiguchi M., Hayashida H., Kuma K., Miyata T., Fukushima S., Murotsu T., et al. Isolation and characterization of the active cDNA of the human cell cycle gene (RCC1) involved in the regulation of onset of chromosome condensation. *Genes Dev.*, **1**, 585-593 (1987).
- Okada A., Alt F.W. Mechanisms that control antigen receptor variable region gene assembly. *Semin. Immunol.*, **6**, 185-196 (1994).
- Paine P.L., Moore L.C., Horowitz S.B. Nuclear envelope permeability. *Nature*, **254**, 109-114 (1975).
- Park J.K., McKeithan T.W., Le Beau M.M., Bitter M.A., Franklin W.A., Rowley J.D., Diaz M.O. An (8;14)(q24;q11) translocation involving the T-cell receptor alpha-chain gene and the MYC oncogene 3' region in a B-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*, **1**, 15-22 (1989).
- Pascarella S., Argos P. A data bank merging related protein structures and sequences. *Protein Eng.*, **5**, 121-137 (1992).
- Paschal B.M., Gerace L. Identification of NTF2, a cytosolic factor for nuclear import that interacts with nuclear pore complex protein p62. *J. Cell. Biol.*, **129**, 925-937 (1995).
- Ponder B.A.J. Genetics and cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, **605**, 369-410 (1980).
- Rabbitts T.H., Hamlyn P.H., Baer R. Altered nucleotide sequences of a translocated c-myc gene in Burkitt lymphoma. *Nature*, **306**, 760-765 (1983).

- Rabbitts T.H., Boehm T. Structural and functional chimerism results from chromosomal translocation in lymphoid tumors. *Adv. Immunol.*, **50**, 119-146 (1991).
- Radu A., Blobel G., Moore M.S. Identification of a protein complex that is required for nuclear protein import and mediates docking of import substrate to distinct nucleoporins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1769-1773 (1995).
- Raimondi S.C., Behm F.G., Roberson P.K., Pui C.H., Rivera G.K., Murphy S.B., Williams D.L. Cytogenetics of childhood T-cell leukemia. *Blood*, **72**, 1560-1566 (1988).
- Raimondi S.C., Pui C.H., Head D.R., Rivera G.K., Behm F.G. Cytogenetically different leukemic clones at relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **82**, 576-580 (1993).
- Reczko M., Bohr H. The DEF data base of sequence based protein fold class predictions. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 3616-3619 (1994).
- Reczko M., Martin A.C., Bohr H., Suhai S. Prediction of hypervariable CDR-H3 loop structures in antibodies. *Protein Eng.*, **8**, 389-395 (1995).
- Rexach M., Blobel G. Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell*, **83**, 683-692 (1995).
- Rihs H.P., Jans D.A., Fan H., Peters R. The rate of nuclear cytoplasmic protein transport is determined by the caseinkinase II site flanking the nuclear localization sequence of the SV40 T-antigen. *EMBO J.*, **10**, 633-639 (1991).
- Rihs H.P., Peters R. Nuclear transport kinetics depend on phosphorylation-site-containing sequences flanking the karyophilic signal of the Simian virus 40 T-antigen. *EMBO J.*, **8**, 1479-1484 (1989).
- Robbins J., Dilworth S.M., Laskey R.A., Dingwall C. Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell*, **64**, 615-623 (1991).
- Rowley J.D. Biological implications of consistent chromosome rearrangements in leukemia and lymphoma. *Cancer Res.*, **44**, 3159-3168 (1984).
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491 (1988).
- Salvati P.D., Ranford P.R., Ford J., Kees U.R. HOX11 expression in pediatric acute lymphoblastic leukemia is associated with T-cell phenotype. *Oncogene*, **11**, 1333-1338 (1995).
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1989).

- Sandberg A.A. The Chromosomes in Human Cancer and Leukemia. *Elsevier/North Holland, New York* (1980).
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467 (1977).
- Santos M.A. An improved method for the small scale preparation of bacteriophage DNA based on phage precipitation by zinc chloride. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 5442 (1991).
- Sawchuk D.J., Weis-Garcia F., Malik S., Besmer E., Bustin M., Nussenzweig M.C., Cortes P. V(D)J recombination: modulation of RAG1 and RAG2 cleavage activity on 12/23 substrates by whole cell extract and DNA-bending proteins. *J. Exp. Med.*, **185**, 2025-2032 (1997).
- Sazer S., Dasso M. The ran decathlon: multiple roles of Ran. *J. Cell Sci.*, **113**, 1111-1118 (2000).
- Schmitz M.L., Baeuerle P.A. The p53 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B. *EMBO J.*, **10**, 3805-3817 (1991).
- Sharp P.A. Splicing of messenger RNA precursors. *Science*, **235**, 766-771 (1987).
- Shen W.F., Largman C., Lowney P., Simonitch T.A., Hack F.M., Lawrence J.H. Expression of homeobox genes in human erythroleukemia cells. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **271**, 211-219 (1989).
- Shen W.F., Largman C., Lowney P., Hauser C.A., Simonitch T.A., Hack F.M., Lawrence H.J. Lineage-restricted expression of homeobox-containing genes in human hematopoietic cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 8536- 8540 (1989).
- Sheibani N., Frazier W.A. Miniprep DNA isolation for automated sequencing of multiple samples. *Anal. Biochem.*, **250**, 117-119 (1997).
- Shih C., Shilo B.Z., Goldfarb M.P., Dannenberg A., Weinberg R.A. Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5714-5718 (1979).
- Sibbald P.R., Argos P. Scrutineer: a computer program that flexibly seeks and describes motifs and profiles in protein sequence databases. *Comput. Appl. Biosci.*, **6**, 279-288 (1990).
- Sleckman B.P., Gorman J.R., Alt F.W. Accessibility control of antigen-receptor variable region gene assembly: role of cis-acting elements. *Annu. Rev. Immunol.*, **14**, 459-481 (1996).
- Smith D.B., Johnson K.S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, **67**, 31-40 (1988).
- Solomon E., Borrow J., Goddard A.D. Chromosome aberrations and cancer. *Science*, **254**, 1153-1160 (1991).

- Soudon J., Bernard O., Mathieu-Mahul D., Larsen C.J. c-myc gene expression in a leukemic T-cell line bearing a t(8;14) (q24;q11) translocation. *Leukemia*, **5**, 60-65 (1991).
- Southern E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517 (1975).
- Southern E.M. Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **100**, 319-323 (1979).
- Su M.T., Venkatesh T.V., Bodmer R. Large- and small-scale preparation of bacteriophage lambda lysate and DNA. *Biotechniques*, **25**, 44-46 (1998).
- Tamura K., Taniguchi Y., Minoguchi S., Sakai T., Tun T., Furukawa T., Honjo T. Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Curr. Biol.*, **5**, 1416-1423 (1995).
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354 (1979).
- Towler D.A., Eubanks S.R., Towery D.S., Adams S.P., Glaser L. Amino-terminal processing of proteins by N-myristoylation. Substrate specificity of N myristoyl transferase. *J. Biol. Chem.*, **262**, 1030-1036 (1987).
- van Gent D.C., Hiom K., Paull T.T., Gellert M. Stimulation of V(D)J cleavage by high mobility group proteins. *EMBO J.*, **16**, 2665-2670 (1997).
- Vogelstein B., Kinzler K.W. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.*, **9**, 138-141 (1993).
- von Lindern M., Breems D., van Baal S., Adriaansen H., Grosveld G. Charakterization of the translocation breakpoint sequences of two DEK-CAN fusion genes present in t(6;9) acute myeloid leukemia and a SET-CAN fusion gene found in a case of acute undifferentiated leukemia. *Genes Chrom. Cancer*, **5**, 227-234 (1992).
- Weinberg, R.A. The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus. *Science*, **230**, 770-776 (1985).
- Weis K., Dingwall C., Lamond A.I. Characterization of the nuclear protein import mechanism using Ran mutants with altered nucleotide binding specificities. *EMBO J.*, **15**, 7120-7128 (1996).
- Whitlock J.A., Raimondi S.C., Harbott J., Morris S.W., McCurley T.L., Hansen-Hagge T.E., Ludwig W.D., Weimann G., Bartram C.R. t(5;14)(q33-34;q11), a new recurring cytogenetic abnormality in childhood acute leukemia. *Leukemia*, **8**, 1539-1543 (1994).
- Wlodarska I., Aventin A., Ingles-Esteve J., Falzetti D., Criel A., Cassiman J.J., Mecucci C., Van den Berghe H., Marynen P. A new subtype of pre-B acute lymphoblastic leukemia with t(5;12)(q31q33;p12), molecularly and cytogenetically distinct from t(5;12) in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*, **89**, 1716-1722 (1997).

- Wu J., Matunis M.J., Kraemer D., Blobel G., Coutavas E. Nup358, a cytoplasmically exposed nucleoporin with peptide repeats, Ran-GTP binding sites, zinc fingers, a cyclophilin A homologous domain, and a leucine-rich region. *J. Biol. Chem.*, **270**, 14209-14213 (1995).
- Yan C., Lee L.H., Davis L.I. Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *EMBO J.*, **17**, 7416-7429 (1998).
- Yokoyama N., Hayashi N., Seki T., Pante N., Ohba T., Nishii K., Kuma K., Hayashida T., Miyata T., Aebi U. A giant nucleopore protein that binds Ran/TC4. *Nature*, **376**, 184-188 (1995).
- Yoneda-Kato N., Look A.T., Kirstein M.N., Valentine M.B., Raimondi S.C., Cohen K.J., Carroll A.J., Morris S.W. The t(3;5)(q25.1;q34) of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia produces a novel fusion gene, NPM-MLF1. *Oncogene*, **12**, 265-275 (1996).
- Yunis J.J. The chromosomal basis of human neoplasia. *Science*, **221**, 227-231 (1983).
- Zutter M., Hockett R.D., Roberts C.W., McGuire E.A., Bloomstone J., Morton C.C., Deaven L.L., Crist W.M., Carroll A.J., Korsmeyer S.J. The t(10;14)(q24;q11) of T-cell acute lymphoblastic leukemia juxtaposes the delta T-cell receptor with TCL3, a conserved and activated locus at 10q24. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 3161-3165 (1990).

7. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Claus R. Bartram für die Bereitstellung des Themas, die wissenschaftliche Zusammenarbeit und seine Unterstützung.

Besonders möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Johannes W.G. Janssen bedanken, der meine Arbeit mitbetreut hat. Die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen, aber auch die soziale Kompetenz im Labor, haben einen wesentlichen Beitrag zu meiner Arbeit geleistet.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Werner Buselmaier und Herrn Prof. Dr. Hans Matzura, die sich als Gutachter dieser Arbeit zur Verfügung bereitgestellt haben.

Unserem Kooperationspartner Dr. Stephen W. Morris (St. Jude Childrens Research Hospital, Memphis, TN, USA) danke für die Bereitstellung der Proben aus t(5;14) ALL-Patienten. Für die Bereitstellung der zahlreichen Zelllinien danke ich Herrn Dr. Hans G. Drexler (DSMZ, Braunschweig).

Meinen Kolleginnen Dorothee Erz, Yvonne Stark und Magdalena Thewes gebührt mein besonderer Dank für Ihre hervorragende technische Unterstützung.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Humangenetik in Heidelberg für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Ich danke meiner Freundin Susanne Lutz für Ihre technische und mentale Unterstützung, die einen wesentlichen Anteil zu dieser Arbeit beigetragen hat.

Schließlich bedanke ich mich bei meinen Eltern für die Unterstützung und Hilfe während dieser Arbeit.